



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Διπλωματική Εργασία:**

***Κινητική μελέτη της αναστολής της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης από  
νουκλεοτιδικά ανάλογα***



**Επιμέλεια:** Μαριάννα Γρινιεζάκη

**Επιβλέπων Καθηγητής:** Δημήτρης Δ. Λεωνίδας

***Λάρισα, Ακαδημαϊκό Έτος 2013-14***

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**Υπεύθυνος Καθηγητής:**

Δημήτριος Δ. Λεωνίδας, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Τριμελής επιτροπή:**

Δημήτριος Δ. Λεωνίδας, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Κοντού Μαρία, Επίκουρος Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας στο τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Μπαλατσός Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας στο τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

***Ευχαριστίες,***

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω την τριμελή μου επιτροπή, και ιδιαιτέρως τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ.Λεωνίδα, για την ευκαιρία που μου έδωσε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όταν μου ανέθεσε το συγκεκριμένο θέμα. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους διδακτορικούς φοιτητές, Δήμητρα Χατζηλεοντιάδου-κυρίως -καθώς και Βύρωνα Γοργογιέτα, για την πολύτιμη καθοδήγηση και υπομονή τους, καθ'όλη τη διάρκεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Τέλος, θα ήταν μεγάλη παράλειψη από μέρους μου να μην ευχαριστήσω την συμφοιτήτριά μου Κατερίνα Τελοπούλου για την άποψη συνεργασία που είχαμε, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου τόσο για τη συνεργασία τους όσο και για το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε.

# **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

|   |    |
|---|----|
| <b>Abstract</b> .....   | 5  |
| <b>Περίληψη</b> .....   | 6  |
| <b>1. Εισαγωγικό τμήμα</b> .....                              | 7  |
| 1.1 Η Βιολογία των ηωσινοφίλων.....                           | 7  |
| 1.2 Η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (EDN).....                     | 11 |
| 1.3 Η δομή της EDN.....                                       | 16 |
| 1.4 Το ενεργό κέντρο της EDN-Καταλυτικός μηχανισμός.....      | 18 |
| 1.5 Οι υποπεριοχές πρόσδεσης του υποστρώματος .....           | 20 |
| 1.6 Η ενζυμική αναστολή.....                                  | 23 |
| 1.7 Αναστολείς.....   | 27 |
| 1.8 Νουκλεοζίτες.....   | 28 |
| 1.9 Μηχανισμός δράσης νουκλεοζιτών.....                       | 29 |
| <b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b> .....                              | 31 |
| <b>2. Πειραματικό τμήμα</b> .....                             | 32 |
| 2.1 Πλασμιδιακοί φορείς.....                                  | 32 |
| 2.2 Η Escherichia Coli ως κύτταρο ξενιστής .....              | 33 |
| 2.3 Καλλιέργεια κυττάρων E.coli.....                          | 34 |
| 2.3.1 Γενικές πληροφορίες.....                                | 34 |
| 2.3.2 Παρασκευή θρεπτικών μέσων για τις καλλιέργειες.....     | 35 |
| 2.3.3 Χρήση αντιβιοτικών ως επιλεκτικά μέσα καλλιέργειας..... | 35 |
| 2.3.4 Πρωτόκολλο καλλιέργειας κυττάρων για παραγωγή EDN.....  | 37 |
| 2.4 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων.....                 | 38 |
| 2.5 Επαγωγή.....  | 38 |
| 2.6 Σύλλογή των κυττάρων.....                                 | 40 |
| 2.7 Λύση των κυττάρων.....                                    | 41 |
| 2.8 Πλύση των κυττάρων & Ομογενοποίηση.....                   | 42 |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.9 Εγκλεισμός της πρωτεΐνης.....   | 44        |
| 2.10 Ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης- Μέθοδος Bradford.....                                | 44        |
| 2.11 Αναδίπλωση της πρωτεΐνης (refolding) .....   | 46        |
| 2.12 Συμπύκνωση της πρωτεΐνης.....  | 47        |
| 2.13 Χρωματογραφικός καθαρισμός της EDN.....  | 47        |
| 2.14 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πήκτη πολυακρυλαμίδιου παρουσία SDS (SDS PAGE)..... | 50        |
| 2.14.1 Πειραματική διαδικασία.....  | 53        |
| 2.14.2 Χρώση με Coomassie Brilliant Blue Staining.....                                  | 54        |
| 2.15 Υπολογισμός συγκέντρωσης της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης.....                       | 55        |
| 2.16 Εισαγωγή Κρυσταλλώσεων.....  | 55        |
| 2.16.1 Διάχυση ατμών.....   | 55        |
| 2.16.2 Τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop).....                              | 56        |
| 2.17 Κινητική μελέτη της EDN.....   | 57        |
| 2.17.1 Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης..            | 57        |
| 2.17.2 Περιγραφή της μεθόδου.....   | 57        |
| 2.17.3 Προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_m$ ).....                       | 58        |
| 2.17.4 Κινητική μελέτη της EDN παρουσία αναστολέα.....                                  | 60        |
| 2.17.5 Επεξεργασία κινητικών δεδομένων για τον υπολογισμό $K_m$ και $IC_{50}$ ...       | 61        |
| <b>3. Αποτελέσματα.....</b>   | <b>64</b> |
| 3.1 Χρωματογραφικός καθαρισμός EDN με στήλη ιοντοανταλλαγής.....                        | 64        |
| 3.2 Ηλεκτροφόρηση κλασμάτων.....  | 66        |
| 3.3 Απόδοση καθαρισμού.....   | 67        |
| 3.4 Κρυστάλλωση.....  | 67        |
| 3.5 Κινητικά Αποτελέσματα.....  | 67        |
| <b>4. Συζήτηση.....</b>   | <b>72</b> |
| <b>5. Βιβλιογραφία.....</b>   | <b>73</b> |

## **ABSTRACT**

Eosinophil-derived neurotoxin (EDN) is one of the four major proteins found in the cytoplasmic granules of human eosinophil leukocytes. It was characterized as a neurotoxin because of its ability to induce the Gordon phenomenon when administered intrathecally in microgram quantities in rabbits and guinea pigs. Besides its neurotoxic activity, EDN has antiviral, bactericidal, and helminthotoxic activities and presents cytotoxicity when ligated to a specific single-chain antibody. EDN is released under allergic, parasitic conditions and during asthma and is also implicated in neurological abnormalities in patients suffering from so-called "hyper-eosinophilic syndrome". Since its ribonucleolytic activity is directly related to its pathological actions, research efforts are being made in order to discover inhibitors that could be used for therapeutic applications. Eosinophil-derived neurotoxin belongs to ribonuclease A (RNase A) superfamily; therefore presents structural similarities with RNase A, especially on the active site. Due to these similarities, the design of selective inhibitors of EDN based on RNase A inhibitors, has been facilitated. In the present work, we studied the inhibitory capacity of two nucleotide derivatives (4d and 6d), which are potent inhibitors of RNase A. Our studies showed that both compounds are moderate inhibitors of the enzyme and provided a model for studying RNase A inhibitors with respect to the specificity of the active site of EDN.

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

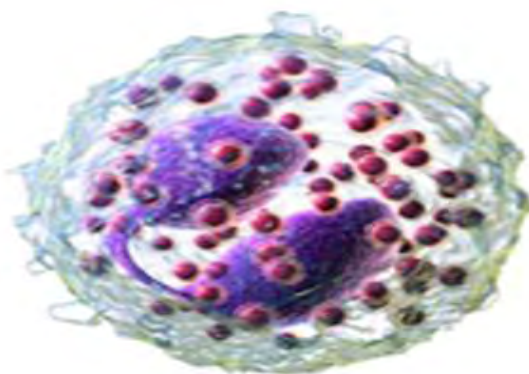
Η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (EDN) είναι μια από τις τέσσερις κύριες πρωτεΐνες που εντοπίζονται στα κοκκία των ανθρώπινων ηωσινόφιλων λευκοκυττάρων. Χαρακτηρίστηκε ως νευροτοξίνη λόγω της ικανότητάς της να επάγει το φαινόμενο Gordon όταν χορηγείται ενδοραχιαίως σε ποσότητες μικρογραμμαρίων σε κουνέλια και ινδικά χοιρίδια. Πέρα από την νευροτοξική της δράση, η EDN εμφανίζει επίσης αντιακή, αντιπαρασιτική, αντιελμινθική δράση καθώς και κυτταροτοξικότητα όταν συνδέεται με ένα συγκεκριμένο μονοκλωνικό αντίσωμα. Απελευθερώνεται σε περιπτώσεις αλλεργικών παθήσεων, άσθματος και φλεγμονών και εμπλέκεται επίσης σε ανωμαλίες νευρολογικής φύσεως σε ασθενείς που πάσχουν από το λεγόμενο «Υπερ-ηωσινοφιλικό σύνδρομο». Επειδή η ριβονουκλεολυτική της δραστηριότητα σχετίζεται άμεσα με τις παθολογικές της δράσεις, γίνονται προσπάθειες για την εύρεση ισχυρών ενζυμικών αναστολέων της, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για το σχεδιασμό νέων φαρμάκων κατά των παθολογικών καταστάσεων στις οποίες εμπλέκεται. Η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη ανήκει στην υπεροικογένεια της ριβονουκλεάσης A (RNase A) και κατά συνέπεια παρουσιάζει σημαντικές δομικές ομοιότητες με την RNase A, κυρίως όσον αφορά το ενεργό κέντρο. Χάρη σε αυτές τις δομικές ομοιότητες, έχει διευκολυνθεί ο σχεδιασμός αναστολέων έναντι της EDN που βασίζεται σε ενώσεις που παρουσιάζουν ισχυρή ανασταλτική δράση (της τάξεως των  $\mu\text{M}$ ), στην RNase A. Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν δύο νουκλεοτιδικά παράγωγα (4d και 6d), τα οποία παρουσιάζουν ισχυρή ανασταλτική δράση στη Ριβονουκλεάση Α. Οι μελέτες μας έδειξαν ότι οι αναστολείς αυτοί παρουσιάζουν μέτρια ανασταλτική δράση στην EDN και δείχνουν πως διάφοροι αναστολείς της RNase A μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην EDN για την διερεύνηση της εξειδίκευσης του καταλυτικού της κέντρου.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

## 1.1. Η βιολογία των ηωσινόφιλων

Τα ηωσινόφιλα είναι πολυμορφοπύρρηνα κοκκιοκύτταρα που διαθέτουν φαγοκυτταρική ικανότητα και μαζί με τα ουδετερόφιλα και τα βασεόφιλα συνιστούν τα κοκκιοκύτταρα του ανοσοποιητικού μας συστήματος<sup>1</sup>. Αν και παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά από τον Wharton Jones το 1846, πήραν την ονομασία τους το 1879 από τον Paul Erlich, λόγω της ιδιότητας του κυτταροπλάσματός τους να βάφεται με την όξινη χρωστική εωσίνη (μέθοδος Romanowsky). Γενικά χαρακτηρίζονται από τη μεγάλη χημική συγγένεια των κοκκίων τους για όξινες χρωστικές ή χρωστικές ανιλίνης, γεγονός που οφείλεται στην πληθώρα των ισχυρά βασικών πρωτεϊνών που περιέχουν<sup>2</sup>.

Συνιστούν, το 1-5 % των περιφερικών λευκοκυττάρων και έχουν μέγεθος 12-17 mm. Αποτελούνται από έναν δίλοβο πυρήνα και ένα κοκκιώδες κυτταρόπλασμα με περίπου 200 κρυσταλλοειδή κοκκία ανά κύτταρο (*Εικόνα 1*).



**Eosinophil**

***Εικόνα 1:** Τρισδιάστατη απεικόνιση του ηωσινόφιλου κυττάρου, όπου διακρίνονται ο δίλοβος πυρήνας και το κοκκιώδες κυτταρόπλασμα.*

Το ηωσινόφιλο περιέχει τρεις τύπους εκκριτικών κοκκίων, τα οποία δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησής του στο μυελό των οστών και συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη: (α) τα ειδικά ή δευτερογενή κοκκία που παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια με την ηωσίνη και περιέχουν τις παρακάτω κυτταροτοξικές ουσίες: μείζονα βασική πρωτεΐνη (MBP), ηωσινόφιλη κατιονική πρωτεΐνη (ECP), ηωσινόφιλη υπεροξειδάση (EPO), ηωσινόφιλη νευροτοξίνη (EDN) και β-γλυκουρονιδάση<sup>3</sup> (β) τα μικρά κοκκία που περιέχουν κυρίως υδρολυτικά ένζυμα, όπως όξινη φωσφατάση κι αρυλσουλφατάση, ενώ μπορεί να περιέχουν και καταλάσες, και (γ) τα πρωτογενή κοκκία τα οποία είναι στρογγυλά, ομοιογενούς πυκνότητας, παρατηρούνται χαρακτηριστικά στα ηωσινόφιλα προμυελοκύτταρα και μυελοκύτταρα και περιέχουν την κρυσταλλική πρωτεΐνη Charcot-Leyden (CLC,

galectin-10). Τα ηωσινόφιλα περιέχουν επίσης σωματίδια κι οργανύλια πλούσια σε λιπίδια (όπως το αραχιδονικό οξύ), όπου γίνεται η σύνθεση λευκοτριενίων, που δε συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη και αυξάνονται σε αριθμό κατά την ενεργοποίησή τους, καθώς και στα ηωσινόφιλα των ασθενών που πάσχουν από ηωσινοφιλία. Η δράση των σωματιδίων αυτών δεν είναι πλήρως διευκρινισμένη.

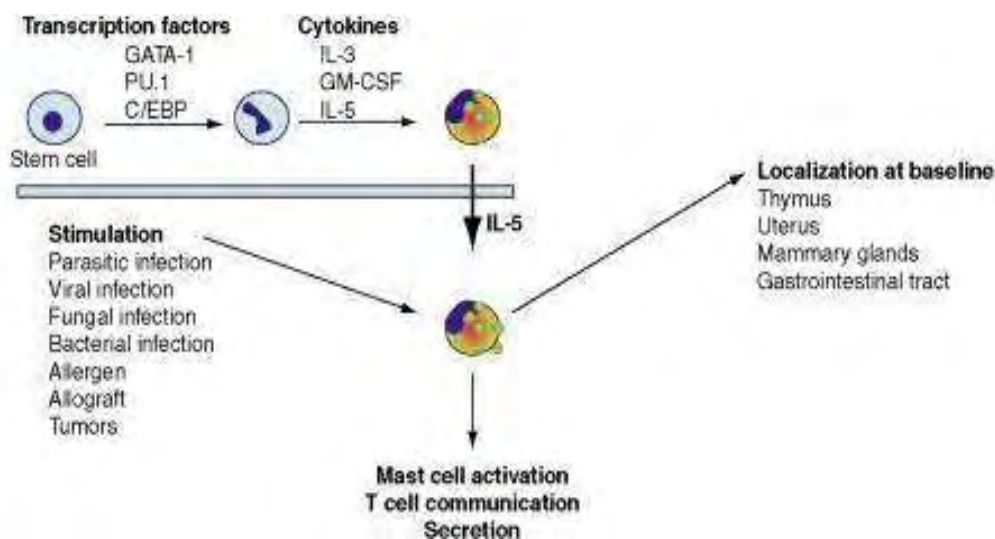
Ωστόσο, αυτό που είναι πλέον βέβαιο είναι πως η δραστηριότητα λύσης των ηωσινόφιλων πηγάζει από τις βασικές ή κατιοντικές πρωτεΐνες που βρίσκονται μέσα στα χαρακτηριστικά κοκκία και απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της αποκοκκίωσης με εξωκύτωση ή κυτταρόλυση<sup>4</sup>. Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν τους διαμεσολαβητές των θετικών και αρνητικών επιδράσεων που προκαλούν τα ηωσινόφιλα<sup>5</sup>. Το γεγονός δε ότι παρουσιάζουν υψηλή τοξικότητα τόσο ενάντια διαφόρων παρασιτικών οργανισμών όσο και των κυττάρων του ίδιου του οργανισμού που τα παράγει είναι ο κύριος λόγος που πλήθος εργαστηρίων παγκοσμίως ασχολείται με τη μελέτη της δομής και δράσης των πρωτεϊνών αυτών<sup>6</sup>.

Τα ηωσινόφιλα παράγονται στο μυελό των οστών από πολυδύναμα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα (HSC), που είναι ικανά να υποστούν αυτο-ανανέωση, ή απόπτωση, και να διαφοροποιηθούν σε προγονικά κύτταρα CD34<sup>+</sup>. Καθώς τα HSC διαιρούνται, πρώτα σχηματίζουν κοινούς λεμφοειδείς και μυελοειδείς προγόνους, που διαφοροποιούνται περαιτέρω σε B, T, ή NK κύτταρα στη λεμφική σειρά ή σε προγόνους κοκκιοκυττάρων / μονοκυττάρων, μεγακαρυοκυττάρων και ερυθροκυττάρων στη μυελική σειρά, με μια διαδικασία που ονομάζεται αιμοποίηση. Η παραγωγή των ηωσινοφίλων περιλαμβάνει έναν καταρράκτη αλληλοεξαρτώμενων ρυθμιστικών γεγονότων όπου συμμετέχουν τουλάχιστον τρεις μεταγραφικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του GATA-1 (μέλος της οικογένειας με δακτύλιο ψευδαργύρου), PU.1 (μέλος της οικογένειας ETS), και C/EBP (μέλος της οικογένειας CCAAT/ενισχυτές σύνδεσης). Ο PU.1 συγκεκριμένα είναι αυτός που καθορίζει το σχηματισμό των κυτταρικών σειρών: έκφραση σε χαμηλά επίπεδα επάγει τη λεμφοειδή σειρά ενώ σε υψηλά επίπεδα επάγει τη διαφοροποίηση σε μυελοειδή σειρά. Έπειτα, οι GATA-1 και ο PU.1 επάγουν συνεργιστικά τη διαφοροποίηση της ηωσινοφιλικής σειράς. Σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση και ωρίμανση των ηωσινόφιλων παίζουν επίσης κυτταροκίνες, όπως είναι η ιντερλευκίνη-3 (IL-3), ο παράγοντας διέγερσης αποικιών των κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (GM-CSF), και η ιντερλευκίνη-5 (IL-5). Η IL-5 αποτελεί τη σημαντικότερη κυτταροκίνη για την παραγωγή των ηωσινόφιλων, κατευθύνοντας επιλεκτικά τη διαφοροποίηση των προγονικών ηωσινόφιλων-βασεόφιλων κυττάρων προς την ηωσινοφιλική σειρά. Μετά την ωρίμανσή τους, η IL-5 φαίνεται να διεγείρει τη μετανάστευσή τους στην περιφερική κυκλοφορία όπου παραμένουν για 8-18 ώρες, μέχρι να μετακινηθούν στους ιστούς στόχους (το θύμο αδένι, τη γαστρεντερική οδό, τη μήτρα και το μαστικό αδένι). Η όλη διαδικασία απεικονίζεται στην **Εικόνα 2**.

Αυτές οι κυτταροκίνες, φαίνεται να ευθύνονται και για την ενεργοποίησή τους. Συγκεκριμένα, σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις παρατηρείται αύξηση του αριθμού τους, η οποία πυροδοτείται μετά από την πρόσδεση ποικίλων παραγόντων στους πολυάριθμους υποδοχείς που φέρουν στην επιφάνειά τους. Μερικοί από τους παράγοντες που έχει βρεθεί πως ενεργοποιούν τα ηωσινόφιλα είναι



ο παράγοντας διέγερσης αποικιών των κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (GM-CSF), η IL-3 και η IL-5.



**Εικόνα 2:** Από το πολυδύναμο αιμοποιητικό βλαστοκύτταρο στο μυελό των οστών, στο ώριμο ηωσινόφιλο.

Ο αριθμός τους αυξάνεται σημαντικά στο αίμα και στους προσβεβλημένους ιστούς σε αλλεργικές καταστάσεις, κατά τη διάρκεια φλεγμονής, άσθματος και σε περιπτώσεις παρασιτικών παθήσεων <sup>8,9,10</sup>. Οι δράσεις των ηωσινόφιλων αναπαρίστανται παρακάτω στην **Εικόνα 3**.

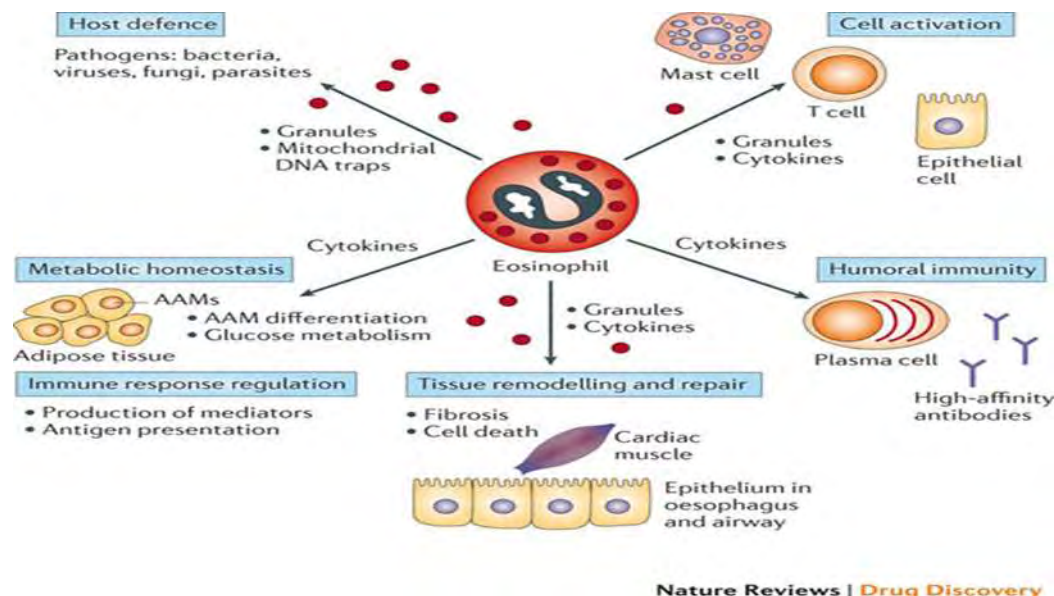
Τα ηωσινόφιλα μαζί με τα βασεόφιλα και τα σιτευτικά κύτταρα, είναι σημαντικοί διαμεσολαβητές αλλεργικών αποκρίσεων και εμπλέκονται στη παθογένεση αλλεργικών ασθενειών όπως το αλλεργικό άσθμα και η ατοπική δερματίτιδα. Τρεις είναι οι λόγοι για τη σύνδεση των ηωσινόφιλων με αυτές τις παθήσεις: 1) εντοπίζονται σε ασθματικούς αεραγωγούς (και σχετικούς ιστούς σε άλλες αλλεργικές παθήσεις), 2) οι διαμεσολαβητές τους σχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου και 3) η απομάκρυνση των ηωσινόφιλων σχετίζεται με τη βελτίωση της ασθένειας <sup>11</sup>. Είναι δραστικά έναντι αντιγόνων που προκαλούν την παραγωγή των IgE-αντισωμάτων και έτσι, στα σημεία εκδήλωσης αντιδράσεων άμεσης (αλλεργικού τύπου) υπερευαισθησίας παρατηρείται ιστική συνάθροιση ηωσινόφιλων. Θεωρείται μάλιστα ότι παίζουν ρόλο στην ενεργοποίηση των σιτευτικών κυττάρων, τα οποία σχετίζονται με το άσθμα. Οι πρωτεΐνες των κοκκίων MBP, ECP και EDN ενεργοποιούν τα σιτευτικά κύτταρα προκαλώντας απελευθέρωση ισταμίνης. Επιπλέον, οι MBP, ECP, EPO που απελευθερώνονται είναι τοξικές για τα επιθηλιακά κύτταρα του βρογχικού επιθηλίου και τα λευκοτριένια όπως τα LTC-4 επιδρούν στο λείο μυ των αεραγωγών με καταστροφικές συνέπειες <sup>11</sup>. Η MBP μάλιστα είναι εκλεκτικός ανταγωνιστής των M2 μουςκαρινικών υποδοχέων, και η απώλεια της λειτουργίας των υποδοχέων αυτών οδηγεί σε βρογχική υπερευαισθησία <sup>12</sup>.

Παίζουν κρίσιμο ρόλο στην παθοφυσιολογία των αλλεργικών αναπνευστικών ασθενειών με αρνητικές κυρίως επιδράσεις: παρ'όλα αυτά έχουν επίσης αναδειχθεί

ως κύτταρα που συμμετέχουν στην άμυνα του ξενιστή. Οι ιοί του αναπνευστικού (RSV, rhinovirus, adenovirus) συγκαταλέγονται στους κύριους παράγοντες που επιδεινώνουν το άσθμα, καθώς προάγουν την παθογένεση. Τα ηωσινόφιλα παίζουν ρόλο στην επίκτητη ανοσία αφού όπως έχει βρεθεί, επιστρατεύονται αποκρινόμενα σε μολύνσεις από ιούς του αναπνευστικού, κυρίως του RSV (respiratory syncytial virus), αλλά και του ιού PIV (parainfluenza virus). Αναστέλλουν λοιπόν τη μολυσματικότητα των συγκεκριμένων ιών <sup>13</sup>, γεγονός που οφείλεται στις RNάσες που περιέχουν, και συγκεκριμένα την EDN και την ECP.

Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί η έντονη χημειοτακτική απόκριση των ηωσινόφιλων σε αρκετούς παράγοντες που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της ανοσοαπόκρισης, αλλά και η περιορισμένη ικανότητα τους να φαγοκυτταρώνουν, συγκριτικά πάντα με άλλα κύτταρα που εμφανίζουν την ίδια ικανότητα. Τα ηωσινόφιλα μπορούν να εκφράσουν μόρια MHC της τάξης II και συν-διεγερτικά μόρια, να αντιμετωπίσουν αντιγόνα και να διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων, καθώς επίσης και να προάγουν την παραγωγή κυτοκινών σε ένα αντιγονο-εξαρτώμενο μοτίβο. Δρώντας μαζί με τα δενδριτικά κύτταρα τα οποία και μπορούν να ενεργοποιήσουν, τα ηωσινόφιλα ρυθμίζουν επίσης την ενεργοποίηση των TH2 κυττάρων κατά τη διάρκεια της ανοσοαπόκρισης μετά από ευαισθητοποίηση με αλλεργιογόνο. Επιπλέον, είναι πλέον αποδεδειγμένη η αποτελεσματική εξωκυττάρια πέψη μεγάλων σε μέγεθος μολυσματικών παραγόντων, όπως είναι οι παρασιτικοί σκώληκες, οι οποίοι αδυνατούν να προσληφθούν στο εσωτερικό του κυττάρου και να αντιμετωπιστούν αναλόγως από ενδογενή κύτταρα. Με άλλα λόγια, τα ηωσινόφιλα χαρακτηρίζονται από εντονότερη εξωκυτταρική απ' ότι ενδοκυτταρική δράση όταν διεγείρεται η κυτταρική τους μεμβράνη <sup>7</sup>. Περιορίζουν συνεπώς τη φλεγμονή (εξουδετερώνουν ορισμένους μεσολαβητές), ενώ παράλληλα έχουν ειδικότητα στη καταστροφή μικροοργανισμών (π.χ. παράσιτα), ανθεκτικών στα λυτικά ένζυμα των ουδετεροφίλων και των μακροφάγων.

Τέλος, η παραγωγή κυτταροκινών όπως των TGF- $\alpha$  και TGF- $\beta$  από τα ηωσινόφιλα, υποδηλώνει το σημαντικό τους ρόλο στην επούλωση πληγών.



**Εικόνα 3:** Τα ηωσινόφιλα παίζουν ρόλο στην άμυνα του ξενιστή, στην ενεργοποίηση των σιτευτικών κυττάρων, των T κυττάρων και των επιθηλιακών κυττάρων, στην προαγωγή της επιβίωσης των μακρόβιων πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών και στη μεταβολική ομοιοστάση μέσω της διατήρησης των εναλλακτικά ενεργοποιημένων μακροφάγων (AAMs) στο λιπώδη ιστό. Επιπλέον, εμπλέκονται στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων καθώς και την επούλωση των ιστών.

## 1.2. Η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (EDN)

Η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη είναι μια μικρή, κατιονική γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 18,4 kDa, που όπως αναφέρθηκε εντοπίζεται στα κυτταροπλασματικά κοκκία των ανθρώπινων ηωσινοφιλικών λευκοκυττάρων. Χαρακτηρίστηκε ως νευροτοξίνη το 1933, όταν ο M. H. Gordon στην προσπάθειά του να βρεί μια μολυσματική αιτιολογία για τη νόσο Hodgkin, περιέγραψε ένα νευροτοξικό σύνδρομο μετά από ενδοεγκεφαλική χορήγηση αιωρήματος ανθρώπινου λεμφαδένου σε κουνέλια. Τελικά, αποδείχθηκε ότι πηγή αυτής της νευροτοξικότητας ήταν τα διηθημένα ηωσινόφιλα. Η πρωτεΐνη που ονομάστηκε ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (EDN) απομονώθηκε και από τους Peterson και Venge, που ονόμασαν αρχικά την πρωτεΐνη τους ηωσινοφιλική πρωτεΐνη X (EPX), έπειτα όμως διαπιστώθηκε ότι επρόκειτο για το ίδιο μόριο<sup>15</sup>. Η εν λόγω νευροτοξίνη είναι επίσης γνωστή ως RNase Us, human liver ribonuclease και μη εκκριτική RNase στην υπάρχουσα βιβλιογραφία.

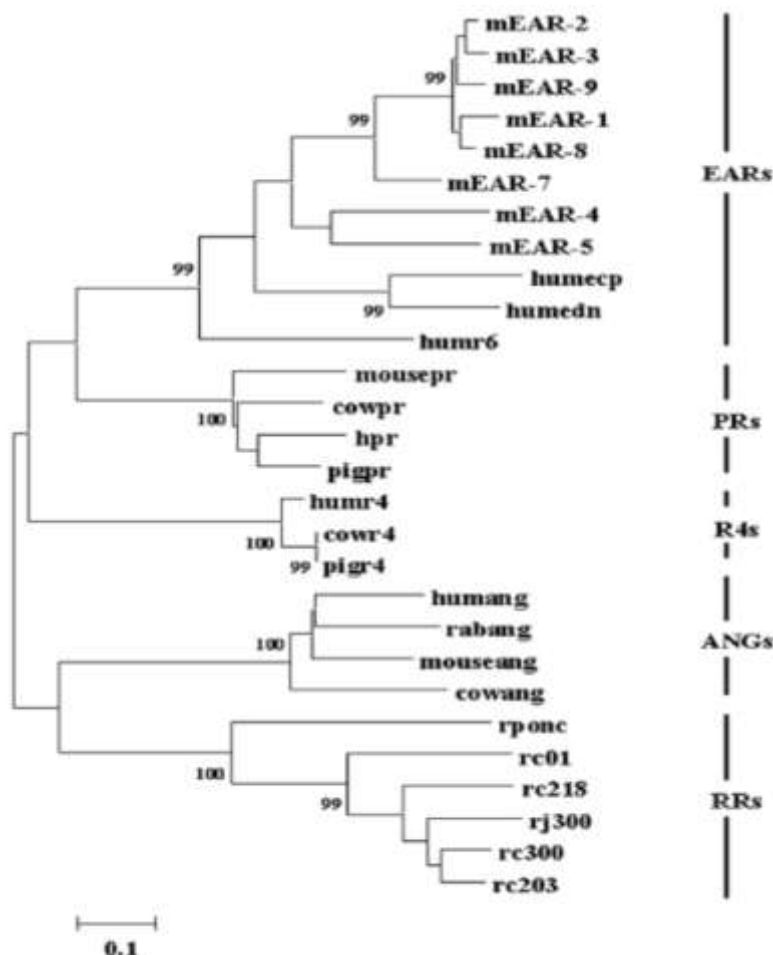
Συντίθεται από μια πρόδρομη πρωτεΐνη 161 αμινοξέων, συμπεριλαμβανομένου ενός σηματοδοτικού πεπτιδίου 27 αμινοξέων, που αποκόπτεται ώστε να σχηματιστεί η ώριμη πρωτεΐνη. Το γονίδιο της EDN συνίσταται από δύο εξόνια που χωρίζονται από ένα μόνο ιντρόνιο, αλλά το δεύτερο εξόνιο είναι αυτό που περιέχει ολόκληρη την κωδική αλληλουχία και τις 3'-αμετάφραστες περιοχές. Βρίσκεται σε ένα ευδιάκριτο γενετικό τόπο (loci) στο χρωμόσωμα 14 (14q24q31), μαζί με το γονίδιο της ECP<sup>16</sup>. Έχει ταυτοποιηθεί μια περιοχή πρόσδεσης της πρωτεΐνης C/EBP στη θέση -124 του

υποκινητή του γονιδίου της EDN, γεγονός που υποδεικνύει τη σημασία της οικογένειας των C/EBP στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της.

Το 1986, ο Gleich και η ομάδα του <sup>17</sup> κατέγραψε την αμινοτελική αλληλουχία της EDN, η οποία δεν είναι όμοια μόνο με την αμινοτελική αλληλουχία της ECP, αλλά, παραδόξως, και με αυτή της ανθρώπινης παγκρεατικής ριβονουκλεάσης. Έτσι, ο Slifman και η ομάδα του <sup>18</sup> έδειξαν ότι η EDN είναι μια ενζυμικά ενεργή ριβονουκλεάση, ικανή να αναγεννά όξινα διαλυτά ριβονουκλεοτίδια από όξινα αδιάλυτα πολυμερικά υποστρώματα σχεδόν εξίσου αποτελεσματικά με την RNase A. Η μοριακή κλωνοποίηση της EDN επιβεβαίωσε την κατά 89% ομολογία των cDNA αλληλουχιών μεταξύ των EDN και ECP και τις ενέταξε στην υπεροικογένεια της RNase A. Η EDN και η ECP λόγω των βιοδράσεων τους, ανήκουν επίσης στην ενδιαφέρουσα ομάδα των RNasών που λέγονται RISBASES ή “ριβονουκλεάσες με ειδικές βιολογικές δράσεις”. Οι ειδικές δράσεις που σχετίζονται με αυτές τις RNάσες, οι οποίες απουσιάζουν από πολλές πιο δραστικές RNάσες, τις καθιστούν πιθανούς θεραπευτικούς παράγοντες.

Βάση κρυσταλλογραφικών μελετών, έχει βρεθεί ότι η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη παρουσιάζει σημαντικές δομικές ομοιότητες με την RNAάση A: η παγκρεατική ριβονουκλεάση A παρουσιάζει 36% ομολογία με την ηωσινόφιλη νευροτοξίνη, της οποίας το κεντρικό καταλυτικό κέντρο (P1) είναι απόλυτα συντηρημένο με αυτό της RNase A. Εντάσσεται έτσι στην υπεροικογένεια της ριβονουκλεάσης A (RNase A) (**Εικόνα 4**), χωρίς ωστόσο να παρατηρείται υψηλό επίπεδο συντήρησης των περιφερικών θέσεων δέσμευσης υποστρώματος. Γι’αυτό το λόγο, η EDN είναι γνωστή και ως RNase 2.

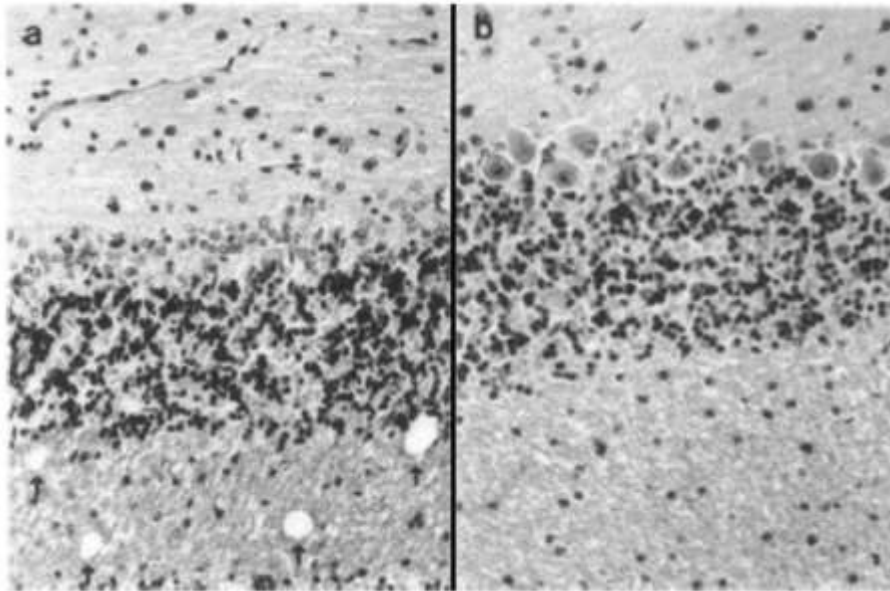
Τα κοινά χαρακτηριστικά της EDN καθώς και των υπόλοιπων μελών της υπεροικογένειας αυτής, μεταξύ των οποίων είναι η αγγειογενίνη (ριβονουκλεάση 5), η ηωσινόφιλη κατιονική πρωτεΐνη (ECP: ριβονουκλεάση 3) και πλήθος κυτταροτοξινών, είναι τα εξής: στην αλληλουχία τους εντοπίζονται 6-8 κυστεΐνες που σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς και περιέχουν από δύο ιστιδίνες και μία λυσίνη, με ένα συντηρημένο μοτίβο αλληλουχίας (CKXXNTF). Ξεχωρίζει ωστόσο από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες των ηωσινοφιλικών κοκκίων λόγω του χαμηλού ισοηλεκτρικού της σημείου, αφού τα ισοηλεκτρικά σημεία των MBP, ECP και EPO είναι περίπου 11, ενώ της EDN μόλις 9. Αυτό πρακτικά σημαίνει, πως σε ιστοκαλλιέργεια, και ειδικότερα σε δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας και *in vitro* τοξικότητας ελμίνθων, η EDN παρουσιάζει μειωμένη δραστηριότητα συγκριτικά με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες <sup>19,20</sup>.



**Εικόνα 4 :** Φυλογενετικό δέντρο της υπεροικογένειας της Ριβονουκλεάσης Α, στο οποίο απεικονίζονται οι εξελικτικές σχέσεις μεταξύ επιλεγμένων μελών της υπεροικογένειας αυτής.

Η EDN χαρακτηρίζεται από νευροτοξικότητα, κυτταροτοξικότητα έναντι των ελμίνθων, αντιβακτηριακή και αντϊκή δράση<sup>13,19,23</sup>.

Όπως αναφέρθηκε, πήρε το όνομά της από την ικανότητά της να αναπαράγει το νευροτοξικό σύνδρομο, που είναι γνωστό ως φαινόμενο Gordon. Τόσο ο Durack με την ομάδα του όσο και ο Fredens με την ομάδα του<sup>22</sup> περιέγραψαν την παθολογία του συνδρόμου: ακαμψία, αταξία και παράλυση, με ιστολογικές βλάβες όπως η απώλεια των κυττάρων Purkinje (**Εικόνα 5**) της παρεγκεφαλίδας και τη σπογγώδη εκφύλιση της. Έως σήμερα, ο μηχανισμός νευροτοξικότητας της EDN δεν έχει διευκρινιστεί, ερευνάται όμως αν η τοξικότητα που ασκείται στα κύτταρα Purkinje είναι άμεση ή αν η κυτταρική απώλεια που παρατηρείται οφείλεται σε έμμεση ενεργοποίηση ενός άλλου τύπου κυττάρων, τα οποία προκαλούν την απελευθέρωση ενός κυτταροτοξικού μεσολαβητή. Επιπλέον, ερευνάται η πιθανότητα η EDN να ασκεί τη δράση της σε συνδυασμό με άλλες ριβονουκλεάσες, όπως είναι η ECP και η ογκονάση, καθώς έχει βρεθεί πως η συνδυαστική δράση αυτών των δύο προκαλεί το νευροτοξικό φαινόμενο όταν ενίονται σε εγκεφαλονωτιαίο υγρό χοίρων<sup>21,22,23</sup>.



**Εικόνα 5:** Ιστοπαθολογικές ανωμαλίες στην παρεγκεφαλίδα κουνελιού ως απόκριση στην EDN. Δεξιά ( σχήμα a) απεικονίζεται φυσιολογικός εγκεφαλικός ιστός, στον οποίο είναι εμφανή τα κύτταρα του Purkinje και η ανέπαφη λευκή ουσία. Αριστερά (σχήμα b) παρατηρείται εγκεφαλικός ιστός μετά από χορήγηση 50µgr καθαρής EDN. Τα κύτταρα του Purkinje έχουν εξαφανιστεί και έχουν σχηματιστεί κενोटόπια στη λευκή ουσία.

Έχει βρεθεί ότι παρουσιάζει και αντιϊκή δράση έναντι ιών με μονόκλωνο RNA. Συγκεκριμένα, χάρη στη ριβονουκλεολυτική της δράση, η ανασυνδυασμένη EDN (rhEDN) ως φαίνεται, μειώνει τη μολυσματικότητα του ιού RSV-B<sup>24,25</sup> (respiratory syncytial virus), ο οποίος σχετίζεται με την εμφάνιση άσθματος, κατά ένα δόσοεξαρτώμενο τρόπο<sup>26</sup>. Δρα επίσης και κατά του υποτύπου 1 του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV-1) σύμφωνα με *in vitro* μελέτες με βάση το υπερκείμενο μικτών καλλιιεργειών λευκοκυττάρων<sup>27</sup>. Η δραστηριότητα ριβονουκλεάσης είναι απαραίτητη αλλά όχι επαρκής για την αντιϊκή της δράση<sup>13</sup>. Η EDN φέρει μια ένθεση εννιά αμινοξέων στο βρόχο L7 του καρβοξυτελικού του άκρου, όπως προκύπτει από σύγκριση με την αντίστοιχη περιοχή στην RNase A, που ευθύνεται για την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με τους ιούς. Ο βρόχος L7 σχηματίζει μία μόνο ελικοειδή στροφή που ακολουθείται από μια δομή όμοια με αυτή της β-στροφής τύπου III, που αποκρίνεται σε ένα βρόχο ωμέγα, και η διαμόρφωση αυτού του βρόχου σταθεροποιείται από διάφορες πολικές αλληλεπιδράσεις<sup>28</sup>. Υπάρχουν τρία κρίσιμα κατάλοιπα σε αυτόν: Arg117, Pro120, και Gln122. Ο βρόχος L7 αλληλεπιδρά και επηρεάζει τη διαμόρφωση του N-αμινοτελικού άκρου της EDN ενώ επίσης αλληλεπιδρά άμεσα με τα virions του RSV και διευκολύνει την πρόσβαση της πρωτεΐνης στο ιικό γονιδίωμα, μέσω διείσδυσης από το ιικό καψίδιο<sup>29</sup>. Η δράση RNάσης της EDN εμφανίζεται μόνο όταν η πρωτεΐνη έρχεται σε επαφή με το ιικό RNA ως συνέπεια της παραγωγικής αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-ιού, στην οποία το κατάλοιπο Arg117 παίζει ρόλο κλειδί. Αξίζει να σημειωθεί ότι καμία εκ των υπόλοιπων ριβονουκλεασών (RNaseA, onconase, RNaseK6) δεν παρουσιάζει αντιϊκή δράση, παρά τη μεγαλύτερη δραστηριότητα τους.



Επιπλέον, μπορεί να ενεργοποιήσει τα μυελοειδή DCs πυροδοτώντας το μονοπάτι σηματοδότησης του υποδοχέα τύπου Toll- 2 (TLR2)– μυελοειδούς παράγοντα διαφοροποίησης 88, καθιστώντας συνεπώς την EDN ως έναν ενδογενή προσδέτη του υποδοχέα TLR2. Μπορεί επίσης να επάγει τη μετανάστευση και ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων (DCs) <sup>30</sup>. Φαίνεται δηλαδή, να δρα ως ένας ενδογενής *alarmin*, που διεγείρει την ενεργοποίηση αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (όπως των δενδριτικών κυττάρων) καθώς και την επίκτητη ανοσία για αντιγονο-ειδική ανοσοαπόκριση μέσω του Th2, συνδέοντας έτσι την φυσική με την επίκτητη ανοσία. Συγκεκριμένα, η EDN είτε από φυσική πηγή είτε ανασυνδυασμένη, ρυθμίζει την έκφραση των CD80, CD83 και CD86 και διεγείρει τα ανθρώπινα DCs να παράγουν ποικίλες προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και να υποστούν φαινοτυπική ωρίμανση <sup>31</sup>. Μαζί με την ενεργοποίηση των DCs, η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη ενεργοποιεί και ενδοκυτταρικούς μεταγωγείς σήματος όπως ο NF-kB και οι MAPKs κινάσες (JNK, p38, και Erks). Ως χημειοτακτικός παράγοντας των iDCs λοιπόν, η EDN μπορεί να συμβάλλει στην επιστράτευση των DCs στις προσβεβλημένες περιοχές, ενισχύοντας την αντιγονο-ειδική ανοσία με το να προάγει τη σύνδεση με το αντιγόνο, την επεξεργασία και τελικά την παρουσίασή του. Η επιστράτευση και ενεργοποίηση τόσο των iDCs όσο και των mDCs στις προσβεβλημένες περιοχές επάγει την ανοσοαπόκριση *in situ*, οδηγώντας στο σχηματισμό του αποκαλούμενου “τρίτογενή λεμφοειδή ιστού” όπως ο σχηματισμός κοκκιώματος γύρω από τα αυγά των ελμίνθων. Εφόσον δεν παράγεται μόνο από ηωσινόφιλα αλλά επίσης από ουδετερόφιλα, μακροφάγα -παρουσία TNF- και *Escherichia coli* -LPS- και συγκεκριμένα επιθηλιακά κύτταρα του πλακούντα, είναι πιθανόν να είναι παρόν στις προσβεβλημένες περιοχές (παρασιτική μόλυνση, αλλεργία ή ατοπική αντίδραση), ακόμα και απουσία των ηωσινοφίλων, επάγοντας την Th2 ανοσοαπόκριση <sup>32</sup>.

Η EDN από μόνη της παρουσιάζει μικρή ή και καθόλου κυτταροτοξικότητα στα σωματικά κύτταρα αν και αποτελεί μια ισχυρή κυτταροτοξίνη όταν ενεθεί στα ωκύτταρα του *Xenopus*. Έχει γνωστοποιηθεί πως όταν προσδένεται σε ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του υποδοχέα της τρανσφερίνης (sFv), η EDN εσωτερικεύεται ως δραστική ριβονουκλεολυτική κυτοτοξίνη. Με βάση την πληροφορία αυτή και μετά από τη διεξαγωγή πειραμάτων σε έγκλειστα της *E.coli*, έχει διαπιστωθεί πως όταν ανθρώπινα κύτταρα που σχετίζονται με την εμφάνιση λευχαιμίας εκφράζουν τον υποδοχέα της τρανσφερίνης, εμφανίζουν ευαισθησία σε νανομοριακές συγκεντρώσεις EDNsFv, προτείνοντας με αυτόν τον τρόπο ότι τα ανθρώπινα ένζυμα μπορούν να παράγονται με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι ικανά να αποκτήσουν κυτταροτοξικές ιδιότητες όταν συντήκονται με αντισώματα. Επομένως, ένζυμα όπως η EDN εμπλέκονται στην παραγωγή πρωτεϊνών μέσω της ανοσολογικής σύντηξης που περιγράφηκε παραπάνω, οι οποίες θα είναι λιγότερο ανοσογονικές συγκριτικά με ανοσοτοξίνες οι οποίες περιέχουν χαρακτηριστικές ομάδες τοξινών βακτηριακής ή φυτικής προέλευσης <sup>33</sup>. Ομοίως, σύντηξη της EDN με την κυτοτοξίνη ογκονάση, οδήγησε στον σχηματισμό μιας χημειοκίτης ριβονουκλεάσης η οποία χαρακτηρίζονταν από αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα, συγκριτικά πάντα με την αρχική EDN, αλλά και αυξημένη κυτταροτοξικότητα. Οι παρατηρήσεις είναι εξαιρετικά σημαντικές καθώς είναι πολύ πιθανό πως θα συμβάλουν δυναμικά στη σχεδίαση καινοτόμων θεραπειών ενάντια στον καρκίνο <sup>34</sup>.

Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη είναι μερικώς υπεύθυνη για κάποιες ανωμαλίες νευρολογικής φύσεως σε ασθενείς με το “Υπερηωσινοφιλικό Σύνδρομο”<sup>35</sup>.

Ακόμα, εντυπωσιακό είναι το γεγονός, ότι το φαινόμενο της υπερηωσινοφιλίας σχετίζεται και με άτομα που πάσχουν από το σύνδρομο της ηωσινοφιλικής μυαλγίας, που συνδέεται με την κατανάλωση της L-τρυπτοφάνης<sup>36</sup>, με άτομα που εμφανίζουν νευρίτιδα<sup>37,38</sup> αλλά και με άτομα που εμφανίζουν πλήθος διαφόρων νευρολογικών επιπλοκών.

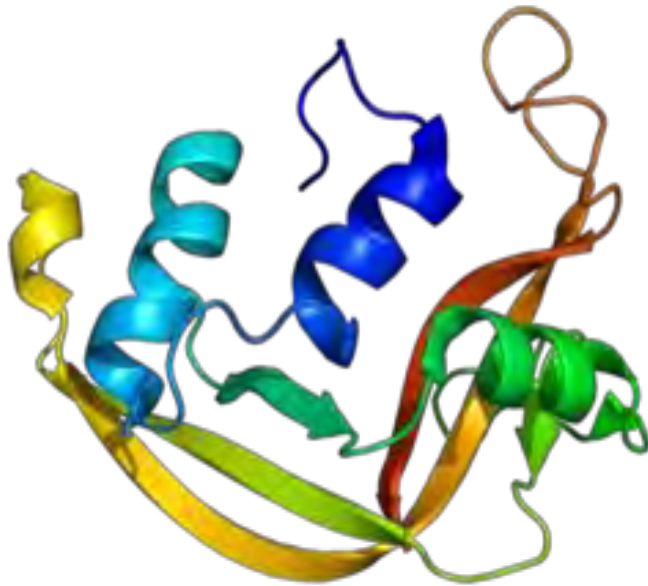
Αξίζει να σημειωθεί, ότι τα επίπεδα της EDN, προσδιοριζόμενα με τη μέθοδο ELISA, πιστεύεται ότι μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως δείκτης (biomarker) για τη διάκριση μεταξύ του άσθματος που επιδεινώνεται από την ασπιρίνη (Aspirin-exacerbated respiratory disease- AERD) και του άσθματος που δεν επηρεάζεται από την ασπιρίνη (Aspirin Tolerant Asthma-ATA)<sup>39</sup>. Η ευαισθησία και εξειδίκευση των επιπέδων της EDN του πλάσματος είναι 95% και 60%, αντίστοιχα, για την πρόβλεψη του AERD χρησιμοποιώντας την ανάλυση MLR. Τα αποτελέσματα δεν δείχνουν μεγάλη εξειδίκευση, δείχνουν όμως μεγάλη ευαισθησία και μάλιστα η AUC (Area Under the Curve) της καμπύλης ROC, που ήταν 0.74, υποδηλώνει υψηλή διαγνωστική ακρίβεια.

### **1.3. Η δομή της EDN**

Προκειμένου να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς δράσης και λειτουργίας μιας πρωτεΐνης, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τη δομή της. Έτσι, έγιναν προσπάθειες για την αναγνώριση της δομής της EDN και το 1996 προσδιορίστηκε για πρώτη φορά σε ευκρίνεια 1.83 Å<sup>28</sup>, η κρυσταλλική δομή της ανασυνδυασμένης ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης. Ακολούθησε η χαρτογράφηση της αρχιτεκτονικής του καταλυτικού της κέντρου μέσω κρυσταλλογραφικών μελετών σύνδεσης μικρών νουκλεοτιδίων<sup>40</sup> και έκτοτε η κρυσταλλική της δομή έχει προσδιοριστεί σε ακόμα μεγαλύτερη ευκρίνεια (0.98 Å)<sup>41</sup>. Επιπλέον, έχει προσδιοριστεί η κρυσταλλική δομή μίας μετα-μεταφραστικά τροποποιημένης μορφής της EDN, στην οποία είχαν προστεθεί τέσσερα επιπλέον αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο, σε ευκρίνεια 1.0 Å<sup>34</sup>. Από τη μελέτη αυτή, προκύπτει το συμπέρασμα ότι τόσο η τροποποιημένη όσο και η φυσική δομή της EDN είναι ουσιαστικά η ίδια.

Πρόκειται λοιπόν για μια μικρή, κατιονική και γλυκοσυλιωμένη πρωτεΐνη, μοριακού βάρους 18,4 kDa, που συγκροτείται από τέσσερις α-έλικες, έξι β-ελάσματα και εννέα βρόχους<sup>42</sup> (**Εικόνα 6**). Στον **Πίνακα 1** δίνονται τα αμινοξέα τα οποία συμμετέχουν στις διαμορφώσεις αυτές<sup>28</sup>.





**Εικόνα 6:** Απεικόνιση της δευτεροταγούς δομής της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης.

**Πίνακας 1:** Τα αμινοξέα που απαρτίζουν τις δευτεροταγές δομές από τις οποίες αποτελείται η EDN.

| Έλικες                | β-ελάσματα              | Βρόχοι                  |
|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>a1 Thr6-Ile16</i>  | <i>β1 Asn39-Leu45</i>   | <i>L1 Lys1-Phe5</i>     |
| <i>a2 Gln22-Arg35</i> | <i>β2 Pro58-Cys 62</i>  | <i>L2 Asn17-Gln21</i>   |
| <i>a3 Thr47-Cys55</i> | <i>β3 Asn69- Ser74</i>  | <i>L3 Arg36-Lys38</i>   |
| <i>a4 Asn92-Cys96</i> | <i>β4 Val78-Pro88</i>   | <i>L4 Gly56-Asn57</i>   |
|                       | <i>β5 Arg97-Arg114</i>  | <i>L5 Pro63-Ser64</i>   |
|                       | <i>β6 Pro124-Ile134</i> | <i>L6 Lys66-Lys69</i>   |
|                       |                         | <i>L7 Ser75-Gln77</i>   |
|                       |                         | <i>L8 Ser89-Gln91</i>   |
|                       |                         | <i>L9 Asp115-Tyr123</i> |

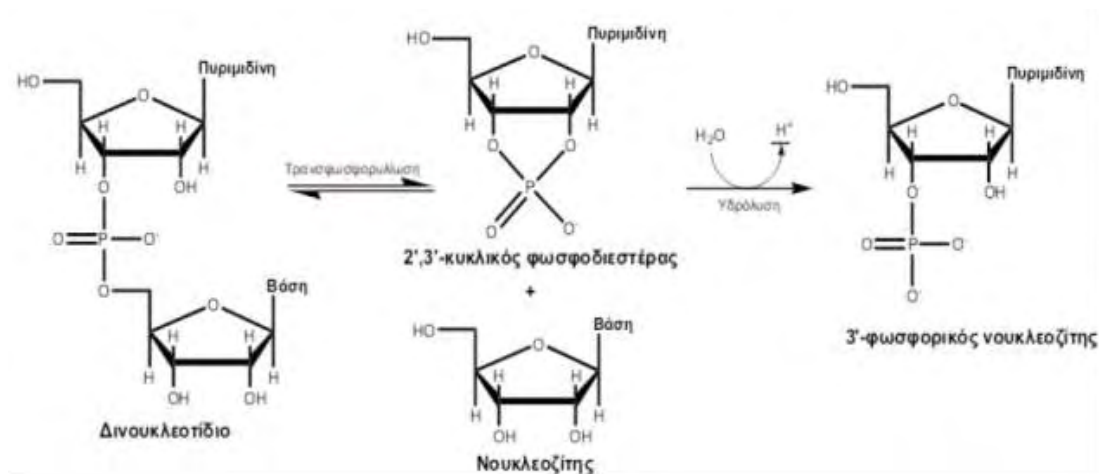
Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης, είναι οι τέσσερις δισουλφιδικοί δεσμοί που περιέχει, οι οποίοι κρίνονται επαρκείς ώστε να προσδώσουν στη μικρή αυτή πρωτεΐνη, μεγάλη σταθερότητα <sup>43</sup>. Οι δεσμοί αυτοί αναπτύσσονται μεταξύ των κυστεϊνών στις θέσεις 23-83, 37-96, 55-111 και 62-71. Ο

πρώτος δεσμός (23-83) συνδέει την έλικα α4 με το έλασμα β4, ο δεύτερος δεσμός (37-96) συνδέει την έλικα α4 με το βρόγχο L3, ο τρίτος δεσμός (55-111) συνδέει την έλικα α3 με το έλασμα β5 και ο τέταρτος δισουλφιδικός δεσμός συνδέει τα ελάσματα β2 και β3 μεταξύ τους. Μάλιστα, αντικατάσταση οποιασδήποτε κυστεΐνης με αλανίνη ή σερίνη μειώνει τη σταθερότητα του ενζύμου ενώ οι δύο δισουλφιδικοί δεσμοί στις θέσεις (23-83) και (55-111), συνεισφέρουν περισσότερο στη σταθερότητα του ενζύμου από ό,τι οι άλλοι δύο δεσμοί<sup>28,42</sup>.

#### **1.4. Το ενεργό κέντρο της EDN- Καταλυτικός μηχανισμός**

Η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη, όπως αναφέρθηκε, είναι μέλος της υπεροικογένειας των ριβονουκλεασών και ασκεί την καταλυτική της δραστηριότητα, δηλαδή τη διάσπαση φωσφοδιεστερικών δεσμών μορίων RNA, με τον ίδιο ακριβώς μηχανισμό που χρησιμοποιεί η ριβονουκλεάση A (*Εικόνα 7*). Το ενεργό κέντρο της EDN, που εντοπίζεται σε μια σχισμή (cleft) κεντρικά του ενζύμου, σχηματίζεται από τρία κύρια κατάλοιπα: His15, Lys38 και His129<sup>42</sup>, τα οποία είναι ομόλογα με αυτά της RNase A -His12, Lys41 και His119. Είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων του υποστρώματος RNA και μάλιστα, παρουσιάζει ειδικότητα πρόσδεσης στις πυριμιδίνες της 3' θέσης του φωσφοδιεστερικού δεσμού που υδρολύεται και στις πουρίνες της 5' θέσης, που συνήθως ακολουθείται από γουανίνη.

Η EDN διασπά τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς του RNA μέσω υδρόλυσης; οι δύο His, είναι υπεύθυνες για την υδρόλυση του φωσφοδιεστερικού δεσμού, ενώ η Lys λόγω του θετικού της φορτίου αλληλεπιδρά με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες. Η υδρόλυση αυτή λοιπόν, όπως και στη ριβονουκλεάση A, συντελείται σε δύο στάδια μέσω ενός 2',3'-κυκλικού φωσφοδιεστέρα. Στο πρώτο στάδιο, γίνεται η τρανσφωσφορυλίωση του 3',5'-φωσφοδιεστερικού δεσμού από την 5'θέση του ενός νουκλεοτιδίου στην 2' θέση του γειτονικού. Αποτέλεσμα είναι η διάσπαση του δεσμού του υποστρώματος, ο σχηματισμός ενός 2',3'-κυκλικού-φωσφοδιεστέρα με ελεύθερο το 3'-φωσφορικό άκρο και η απελευθέρωση μιας 5'-OH ομάδας. Στο δεύτερο στάδιο, γίνεται η υδρόλυση του 2',3'-κυκλικού-φωσφοδιεστέρα δίνοντας μια 3'-μονοφωσφορική ομάδα<sup>44</sup>. Η αντίδραση τρανσφωσφορυλίωσης είναι ταχύτερη και αντιστρεπτή σε σχέση με την υδρόλυση, η οποία είναι πρακτικά μη αντιστρεπτή. Ο 2',3'-κυκλικός-φωσφοδιεστέρας δεν είναι ένα ενδιάμεσο, αλλά κανονικό προϊόν, καθώς απελευθερώνεται μετά την τρανσφωσφορυλίωση<sup>45</sup>. Το στάδιο της υδρόλυσης δεν ξεκινά παρά μόνο όταν δεν υπάρχει πλέον υπόστρωμα για τρανσφωσφορυλίωση. Το νουκλεοτίδιο, το οποίο βρίσκεται στην 3'-πλευρά του δεσμού του υποστρώματος που διασπάται από το ένζυμο πρέπει να είναι μια πυριμιδίνη, γιατί ο πουρινικός δακτύλιος είναι πολύ μεγάλος για να χωρέσει στο ενεργό κέντρο χωρίς να το στρεβλώσει.



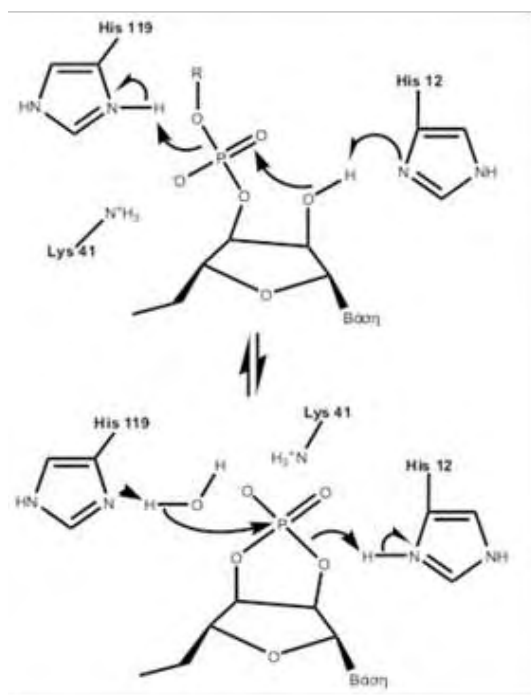
**Εικόνα 7:** Η αντίδραση που καταλύεται τόσο από την *Rnase A* όσο και από την *EDN*.

Τα αμινοξέα που παίζουν ρόλο στην καταλυτική δραστηριότητα της *EDN* είναι όπως αναφέρθηκε: η His15, Lys38 και His129 (δηλαδή τα ομόλογα των His12, His119 και Lys 41 της *RNase A*) (**Εικόνα 8**). Η αντίδραση ξεκινά με την προσβολή του φωσφόρου του δεσμού που διασπάται από το 2'-O με τον ακόλουθο τρόπο: πρώτα, η μη ιοντισμένη μορφή της His12 προσλαμβάνει ένα πρωτόνιο από το 2'-OH, το οποίο αυξάνει τον πυρηνόφιλο χαρακτήρα αυτού του O. Την ίδια στιγμή, η πρωτονιωμένη μορφή της His119 παρέχει το πρωτόνιό της στο 5'-O, και το 2'-O σχηματίζει δεσμό με το P, ο οποίος μεταβατικά σχηματίζει δεσμούς με πέντε άτομα οξυγόνου.

Αυτή η πεντασθενής μεταβατική κατάσταση σταθεροποιείται ηλεκτροστατικά από τη θετικά φορτισμένη πλευρική αλυσίδα της Lys41 που βρίσκεται πολύ κοντά. Ο δεσμός μεταξύ P και του 5'-O διασπάται όταν το πρωτόνιο από την His119 έχει μεταφερθεί πλήρως σε αυτό το άτομο O. Την ίδια στιγμή, σχηματίζεται μεταξύ του P και του 2'-O παράγοντας το 2',3'-κυκλικό ενδιάμεσο. Το δεύτερο στάδιο αυτής της αντίδρασης, που είναι η υδρόλυση του κυκλικού ενδιαμέσου, είναι σχεδόν μία αντίστροφη πορεία του πρώτου σταδίου με τη διαφορά ότι ένα μόριο ύδατος αντικαθιστά το 5'-O που είχε απομακρυνθεί. Τώρα ο δότης πρωτονίων είναι η His12 και ο δέκτης πρωτονίων είναι η His119. Η παρουσία της His στο ενεργό κέντρο πολλών ενζύμων οφείλεται στην ικανότητα της να δρα είτε ως οξύ είτε ως βάση σε φυσιολογικό pH.

Η γεωμετρία της πεντασθενούς μεταβατικής κατάστασης έχει ενδιαφέρον. Όταν ο φώσφορος γίνει πεντασθενής, η γεωμετρία τετραέδρου του φωσφόρου στο RNA αλλάζει σε μια τριγωνική διπυραμίδα. Ο φώσφορος καταλαμβάνει το κέντρο, τρία άτομα οξυγόνου βρίσκονται στο ισημερινό επίπεδο και δύο στις κορυφές της διπυραμίδας. Κατά τον σχηματισμό του κυκλικού ενδιαμέσου, το απερχόμενο 5'-O βρίσκεται στη μία κορυφή και το εισερχόμενο 2'-O βρίσκεται στην άλλη κορυφή της διπυραμίδας. Κατά την υδρόλυση αυτού του ενδιαμέσου ένα άτομο O από το νερό βρίσκεται στη μία κορυφή και το 2'-O βρίσκεται στην άλλη. Σε κάθε στάδιο, μία

κορυφή καταλαμβάνεται από την επιτιθέμενη πυρινόφιλη ομάδα και η άλλη κορυφή από την ομάδα που απομακρύνεται <sup>45</sup>.



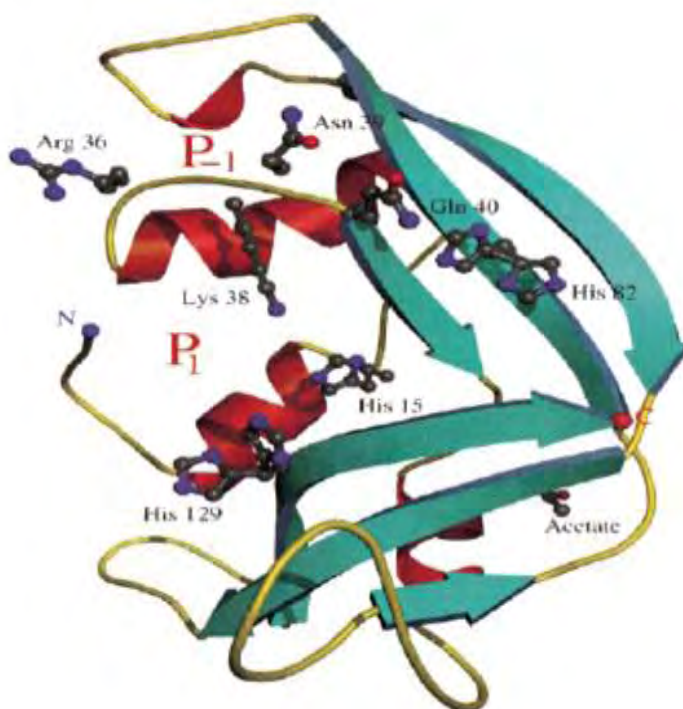
**Εικόνα 8:** Ο μηχανισμός κατάλυσης στη ριβονουκλεάση A.

### 1.5. Οι υποπεριοχές πρόσδεσης του υποστρώματος

Μετά από κρυσταλλογραφικές μελέτες συμπλόκων της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης, με διάφορα ανάλογα υποστρώματος, καθώς επίσης και από μια σειρά πειραμάτων μεταλλαξιγένεσης σε αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου, προσδιορίστηκαν έξι βοηθητικές περιοχές πρόσδεσης του υποστρώματος: οι P<sub>-1</sub>, P<sub>0</sub>, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> και B<sub>3</sub> <sup>46</sup>.

Ο πυρήνας του καταλυτικού κέντρου αποτελείται από τις ενεργές υποπεριοχές B<sub>1</sub>, P<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, που βρίσκονται κεντρικά τοποθετημένες όπως σε όλα τα μέλη της υπεροικογένειας της RNase A. Οι B<sub>1</sub> και B<sub>2</sub> υποπεριοχές είναι θέσεις πρόσδεσης των νουκλεοτιδικών βάσεων, που βρίσκονται τοποθετημένες ανοδικά (B<sub>1</sub>) και καθοδικά (B<sub>2</sub>) του φωσφοδιεστερικού δεσμού, όπου λαμβάνει χώρα η διάσπαση του RNA (P<sub>1</sub>). Επίσης, αξίζει να αναφέρουμε ότι στην υποπεριοχή B<sub>1</sub> προσδένονται μόνο πυριμιδίνες τόσο στην EDN όσο και στην RNase A ενώ στην υποπεριοχή B<sub>2</sub> για πουρίνες, όπως συμβαίνει και με τις υπόλοιπες ριβονουκλεάσες <sup>47</sup>. Οι δομικές διαφορές ωστόσο στις υποπεριοχές B<sub>1</sub> και B<sub>2</sub>, οδηγούν σε αλλαγές στην εξειδίκευση του υποστρώματος. Γενικά, για την EDN έχει βρεθεί ότι με πολυνουκλεοτιδικά υποστρώματα, το ένζυμο έχει 20 φορές μεγαλύτερη προτίμηση για κυτιδίνες συγκριτικά με τις ουριδίνες στην περιοχή B<sub>1</sub> και 100 φορές μεγαλύτερη προτίμηση για αδενοσίνες στην περιοχή B<sub>2</sub> <sup>48</sup>.

Αν και αυτές οι περιοχές είναι υψηλά συντηρημένες μεταξύ της RNase A και της EDN, οι υπόλοιπες περιφερικές υποπεριοχές που ευθύνονται για την πρόσδεση του φωσφοδιεστέρα ανοδικά της  $B_1$  υποπεριοχής και καθοδικά της  $B_2$  υποπεριοχής, δηλαδή οι  $P_0$  και  $P_2$  υποπεριοχές αντίστοιχα, διαφέρουν ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες<sup>49</sup> (**Εικόνα 10**). Οι  $P_2$  και  $P_0$  υποπεριοχές όπως και η  $P_1$ , είναι θέσεις πρόσδεσης φωσφορικών ομάδων. Επιπλέον, μια νέα υποπεριοχή, η  $P_{-1}$ , έχει εντοπιστεί στην EDN (**Εικόνα 9**).



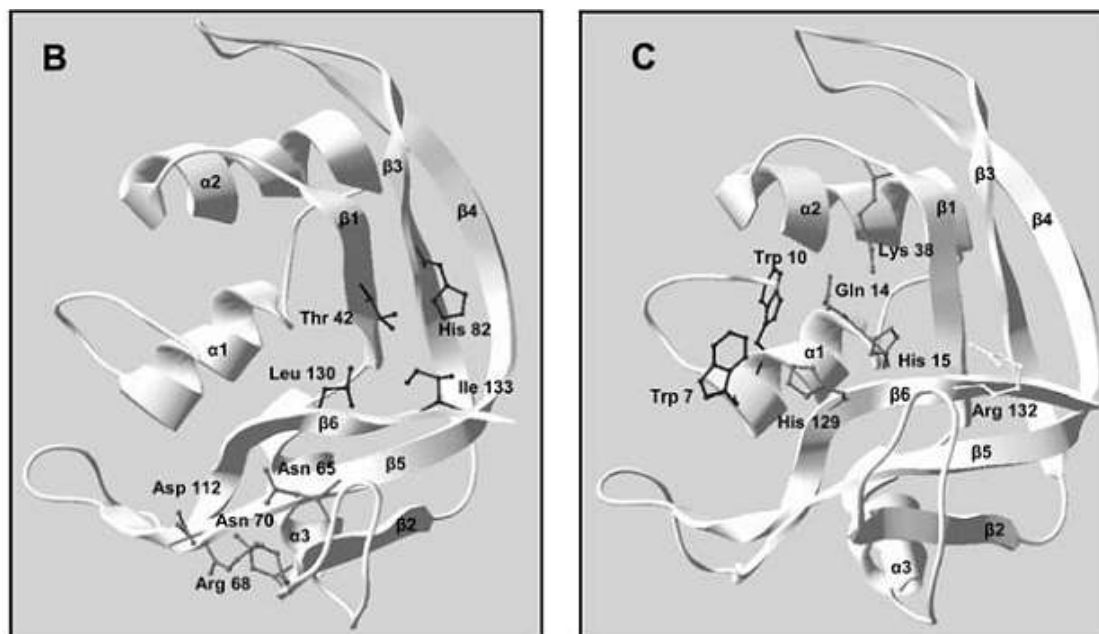
**Εικόνα 9:** Αναπαράσταση της rEDN σε ευκρίνεια 0,98Å. Στην εικόνα εμφανίζεται υποπεριοχή  $P_1$  (Subsite  $P_1$ ) η οποία αποτελείται από τα εξής αμινοξέα: His15, Lys38, and His129. Επιπλέον γίνεται ορατή η υποπεριοχή  $P_{-1}$  η οποία αποτελείται από Arg36, Asn39, και Gln40. Επίσης, παρατηρείται η His82 της  $B_1$  δευτερεύουσας περιοχής. Το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο αναπαρίστανται ως μπλε και κόκκινες σφαίρες, αντίστοιχα. Τέλος, στη δομή αυτή παρουσιάζεται και ένα μόριο οξικού άλατος.

Συγκεκριμένα για τις υποπεριοχές της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης είναι γνωστό ότι:

- ✚ Η  $P_1$  υποπεριοχή της EDN έχει την ικανότητα πρόσδεσης της φωσφορικής ομάδας μετά τη διάσπαση του φωσφοδιεστερικού δεσμού, καθώς και θεικών ανιόντων<sup>28</sup>. Αποτελείται από τρία κρίσιμα κατάλοιπα: His15, Lys38 και His129, τα οποία σχηματίζουν μια τριάδα η οποία είναι συντηρημένη σε όλες της παγκρεατικού τύπου ριβονουκλεάσες που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα. Η  $P_1$  εντοπίζεται στο ενεργό κέντρο της EDN και μπορεί να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου με Gln14 N<sup>e2</sup>, His15 N<sup>e2</sup>, His129 N<sup>d1</sup> και Leu130 N<sup>21</sup>.

- ✚ Η B<sub>1</sub> υποπεριοχή της EDN, που είναι συντηρημένη συγκριτικά με αυτή της ριβονουκλεάσης A , αποτελείται από τα εξής κατάλοιπα: Thr42, Leu130, His82 και Ile133. Η περιοχή αυτή είναι εξαιρετικά σημαντική χάρη στη Thr42 που όπως και στην RNase A (Thr45), έχει την ικανότητα να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με πυριμιδίνες <sup>41</sup> -μια κυτοσίνη ή ουρακίλη του ενεργού κέντρου του συνδεδεμένου υποστρώματος. Αυτοί οι δεσμοί επηρεάζουν την προτίμηση της EDN για κυτοσίνη παρά για ουρακίλη. Έτσι, η ειδικότητα του ενζύμου για poly(C) είναι μεγαλύτερη από ότι για poly(A), ενώ δεν έχει καθόλου ειδικότητα για poly(G).
- ✚ Η B<sub>2</sub> υποπεριοχή της EDN είναι μερικώς συντηρημένη με αυτή της ριβονουκλεάσης A και περιλαμβάνει τα κατάλοιπα αμινοξέων Arg68, Asn70, Asn65 και Asp112. Στην υποπεριοχή αυτή, δεσμεύεται η νουκλεοτιδική βάση που βρίσκεται καθοδικά του φωσφοδιεστερικού δεσμού που υφίσταται τη διάσπαση και χαρακτηρίζεται από υψηλή προτίμηση για πουρίνες. Δύο από τα αμινοξέα που την απαρτίζουν, η Arg68 και Asp112, μπορούν να αποκτούν δύο εναλλακτικές διαμορφώσεις, που δεν έχουν κάποια φυσιολογική σημασία αλλά είναι ενδεικτικές της διαμορφωτικής ελευθερίας που χαρακτηρίζει τα αμινοξέα αυτά. Οι εναλλακτικές διαμορφώσεις αυτών των αμινοξέων εμπλέκονται σε δεσμούς υδρογόνου με γειτονικά μόρια νερού <sup>41</sup>.
- ✚ Η P<sub>0</sub> υποπεριοχή, που έχει την ικανότητα να προσδένει φωσφορικές ομάδες <sup>28</sup>, αλληλεπιδρά με τις φωσφορικές ομάδες που βρίσκονται γειτονικά της 5' θέσης κοπής του νουκλεοτιδίου που είναι συνδεδεμένο στη B<sub>1</sub> υποπεριοχή, ενώ η P<sub>2</sub> υποπεριοχή αλληλεπιδρά με τις φωσφορικές ομάδες που βρίσκονται γειτονικά της 3' θέσης κοπής του νουκλεοτιδίου που είναι συνδεδεμένο στη B<sub>2</sub> περιοχή. Οι περιοχές αυτές διαφέρουν μεταξύ της EDN και της RNase A και αποτελούνται από τα εξής κατάλοιπα: Ser64, Trp7 και Trp10, από τα οποία απουσιάζει η ικανότητα πρόσδεσης θεικών ανιόντων <sup>28,41</sup>.
- ✚ Η υποπεριοχή P-1 είναι μια νέα υποπεριοχή που εμφανίζεται μόνο στην EDN και η οποία έχει την ικανότητα πρόσδεσης θεικών ανιόντων και φωσφορικών ομάδων 21. Αποτελείται από τα κατάλοιπα Arg36, Asn39, και Gln40 <sup>28</sup> και φαίνεται να είναι κρίσιμη για τη δραστηριότητα ριβονουκλεάσης της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης <sup>50</sup>.





**Εικόνα 10:** Απεικόνιση της δευτεροταγούς δομής της EDN. Στο σχήμα B παρατηρούμε τα κατάλοιπα με μαύρο χρώμα που περιλαμβάνονται στη B<sub>1</sub> υποπεριοχή και με γκρι χρώμα στη B<sub>2</sub> υποπεριοχή αντίστοιχα. Στο σχήμα C τα κατάλοιπα με μαύρο χρώμα αποτελούν την P<sub>2</sub> υποπεριοχή, με γκρι χρώμα την P<sub>1</sub> και με λευκό την P<sub>0</sub>.

### 1.6. Η ενζυμική αναστολή

Η δραστηριότητα πολλών ενζύμων μπορεί να ανασταλεί από την πρόσδεση ειδικών μικρών μορίων ή ιόντων. Οποιαδήποτε ουσία λοιπόν ελαττώνει την ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης μπορεί να θεωρηθεί σαν ένας αναστολέας. Αυτός ο τρόπος της αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας παίζει το ρόλο του κύριου μηχανισμού ελέγχου στα βιολογικά συστήματα. Πολλά φάρμακα και τοξικοί παράγοντες δρουν μέσω της αναστολής των ενζύμων. Η αναστολή από ειδικές χημικές ουσίες μπορεί να είναι πηγή για την κατανόηση του μηχανισμού της ενζυμικής δράσης.

Οι αναστολείς διακρίνονται σε αντιστρεπτούς και μη αντιστρεπτούς και η ενζυμική αναστολή μπορεί να είναι: συναγωνιστική (competitive inhibition), μη-συναγωνιστική (non-competitive inhibition), ασυναγωνιστική ή ανταγωνιστική (uncompetitive inhibition), μικτή (mixed type inhibition) και βραδείας δεσμεύσεως (slow-binding inhibition).

Οι όροι αντιστρεπτός και μη αντιστρεπτός αναστολέας περιγράφουν κυρίως το πόσο γρήγορα μπορεί να αποδεσμευτεί ο αναστολέας από το ένζυμο. Για τον λόγο αυτό, συχνά χρησιμοποιούνται οι όροι απενεργοποιητής (inactivator) και επανενεργοποίηση (reactivation).

Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας αντιδρά χημικά με κάποιο στοιχείο του ενεργού κέντρου, και είτε παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος, είτε

εξουδετερώνει κάποια πλευρική αλυσίδα ενός αμινοξέος που συμμετέχει στην καταλυτική διεργασία ( $E + I \rightarrow EI$ ). Διαχωρίζεται πολύ αργά από το ένζυμο στόχο, διότι συνδέεται πολύ ισχυρά με το ένζυμο, είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά, και δεν μπορεί να απομακρυνθεί με ήπιες μεθόδους<sup>51</sup>. Πολλές φορές, οι συνέπειες μίας μη αντιστρεπτής αναστολής μπορούν να αντιστραφούν με χημικά μέσα, με αποτέλεσμα το ένζυμο να μπορεί να δράσει ξανά.

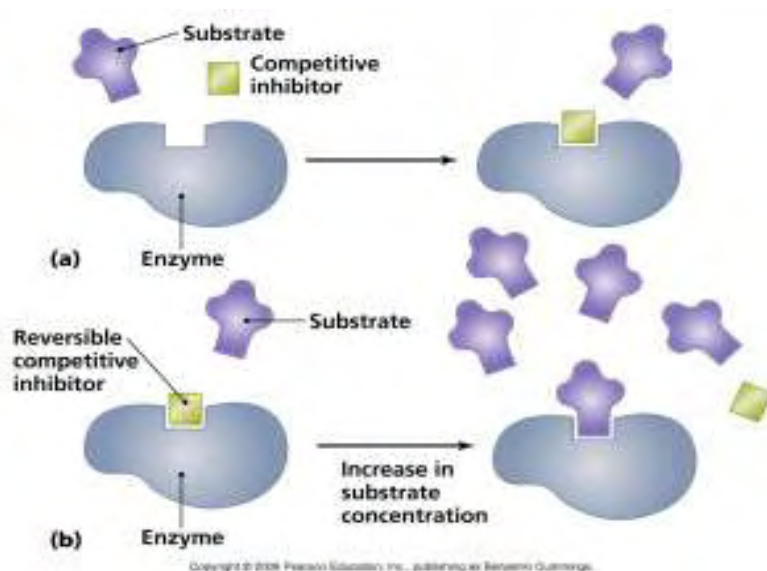
Ως αντιστρεπτός αναστολέας ορίζεται ο αναστολέας εκείνος, ο οποίος μπορεί να αφαιρεθεί σχετικά εύκολα από το περιβάλλον του ενζυμικού συστήματος, και όταν πραγματοποιηθεί η αφαίρεση αυτή, το ένζυμο επανακτά πλήρως τη δραστηριότητά του. Η αντιστρεπτή αναστολή, σε αντίθεση με τη μη αντιστρεπτή αναστολή, χαρακτηρίζεται από έναν ταχύ διαχωρισμό του συμπλόκου ενζύμου – αναστολέα (**Εικόνα 11**). Έτσι αποκαθίσταται μια κατάσταση ισορροπίας όπως περιγράφεται στη σχέση (1).

$E + I \rightarrow EI$  (1) όπου I: ο αναστολέας και EI: το σύμπλοκο ενζύμου -αναστολέα.

Η σταθερά διάστασης για τον αναστολέα δίνεται από τη σχέση 2:

$$K_i = [EI]/[E][I] \quad (2).$$

Ενώ η σταθερά Michaelis  $K_m$  αποτελεί μέτρο της αγχιστείας του ενζύμου με το υπόστρωμα, η σταθερά  $K_i$  είναι το αντίστροφο της αγχιστείας του ενζύμου με τον αναστολέα.



**Εικόνα 11:** Απεικόνιση της δράσης ενός μη αντιστρεπτού και ενός αντιστρεπτού συναγωνιστικού αναστολέα, αντίστοιχα. Στην περίπτωση του αντιστρεπτού αναστολέα, αυτός απομακρύνεται μετά από αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος.

Διακρίνονται οι τέσσερις τύποι αντιστρεπτής ενζυμικής αναστολής:

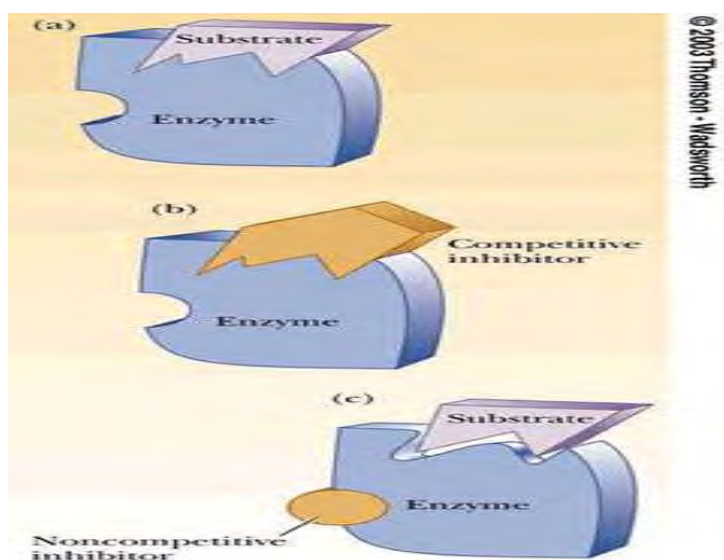


#### A) Συναγωνιστική αναστολή:

Όταν ο αναστολέας δεσμεύεται αμφίδρομα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και παρεμποδίζει την δέσμευση του υποστρώματος, με το οποίο παρουσιάζει δομική ομοιότητα, καλείται συναγωνιστικός αναστολέας. Στη συναγωνιστική αναστολή το ένζυμο μπορεί να προσδένει υποστρώματα (σχηματίζοντας το σύμπλοκο ES) ή αναστολέα (EI), αλλά όχι και τα δύο (ESI). Ο αναστολέας αυτός, ελαττώνει την ταχύτητα της κατάλυσης, με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεδεμένα σε ένα υπόστρωμα. Η παρουσία συναγωνιστικού αναστολέα αυξάνει την  $K_m$  ως προς το υπόστρωμα, αλλά δεν επηρεάζει τη  $V_{max}$ . Η μεγαλύτερη αναστολή εμφανίζεται όταν η τιμή της συγκέντρωσης του αναστολέα  $[I]$  ή η τιμή της συγκέντρωσης του υποστρώματος  $[S]$  είναι χαμηλή. Μετά από κινητικές μελέτες, παρατηρούμε λοιπόν ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση ενός συναγωνιστικού αναστολέα, απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος για να επιτευχθεί μια ιδιαίτερη ενζυμική ταχύτητα. Αντίθετα, παρουσία του αναστολέα, η αναστολή μπορεί να υπερνικηθεί αυξάνοντας την ποσότητα του υποστρώματος: έτσι η ταχύτητα φτάνει στη μέγιστη τιμή της ( $V_{max}$ ). Επιπλέον, παρατηρείται μεταβολή στην φαινομενική τιμή της  $K_m$ . Αυτή η νέα τιμή, η οποία ονομάζεται  $K_m^{app}$  ισούται με:

$K_m^{app} = K_m (1 + [I]/K_i)$ , όπου  $[I]$ : η συγκέντρωση του αναστολέα και  $K_i$ : η σταθερά διάσπασης του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα.

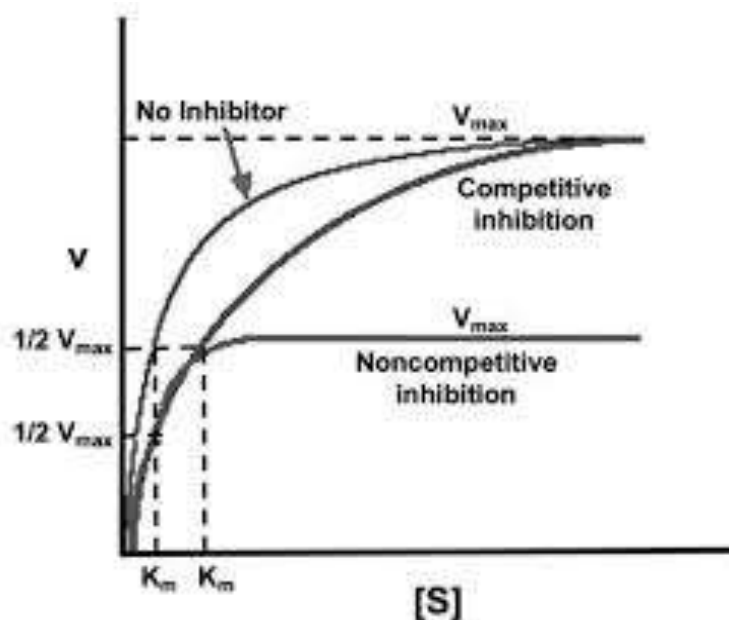
Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του αναστολέα, αυξάνεται και η  $K$ . Ένα ένζυμο θα έχει την ίδια μέγιστη ταχύτητα όταν υπάρχει συναγωνιστικός αναστολέας, όπως επίσης και όταν δεν υπάρχει<sup>51,52</sup> (**Εικόνα 12**).



**Εικόνα 12:** Σχηματική απεικόνιση του ενζύμου απουσία (a) και παρουσία συναγωνιστικού (b) ή μη- συναγωνιστικού αναστολέα (c). Αν και στην 3<sup>η</sup> περίπτωση μπορεί να έχουμε ταυτόχρονη πρόσδεση του υποστρώματος, μόνο στην πρώτη περίπτωση παράγεται προϊόν.

### **B) Μη συναγωνιστική αναστολή:**

Στη μη συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας αντί να συναγωνίζεται με το υπόστρωμα για δέσμευση στο ενεργό κέντρο, δεσμεύεται σε διαφορετική περιοχή. Έτσι, η πρόσδεση του αναστολέα δεν επηρεάζει την πρόσδεση του υποστρώματος και αντίστροφα με αποτέλεσμα να μπορούν προσδένονται ταυτόχρονα σε ένα μόριο ενζύμου, σε διαφορετικές περιοχές πρόσδεσης. Κατ' αυτόν τον τρόπο, είναι δυνατόν να δημιουργηθεί ένα τριπλό σύμπλοκο του τύπου EIS (**Εικόνα 13**). Ένα σύμπλοκο όμως ενζύμου-αναστολέα-υποστρώματος (ESI) δεν μπορεί να παράγει προϊόν, παρά τη πρόσδεση του υποστρώματος. Η μη-συναγωνιστική αναστολή, σε αντίθεση με τη συναγωνιστική αναστολή, δε μπορεί να ξεπεραστεί μέσω της αύξησης της συγκέντρωσης του υποστρώματος<sup>51,52</sup>. Συνεπώς η ταχύτητα δε μπορεί να φτάσει σε μέγιστη τιμή  $V_{max}$ , ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος. Σε αυτόν τον τύπο της αναστολής, ο αναστολέας μειώνει την ολική συγκέντρωση του λειτουργικού ενζύμου, μιας και το ουσιαστικό αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης αναστολέα-ενζύμου είναι η αφαίρεση μορίων ενζύμου από το σύστημα, ενώ το ένζυμο που απομένει συμπεριφέρεται ως ένα περισσότερο αραιό διάλυμα του ενζύμου. Έτσι, η τιμή της  $V_{max}$  ελαττώνεται σε μία νέα τιμή που καλείται  $V_m^{app}$ , ενώ δεν παρατηρείται μεταβολή στην τιμή της  $K_m$ .



**Εικόνα 13:** Διάγραμμα που απεικονίζει την κινητική ενός μη-συναγωνιστικού αναστολέα, συναγωνιστικού αναστολέα, και απουσία αναστολέα.

### Γ) Μικτή αναστολή:

Σε αυτόν τον τύπο αναστολής, μεταβάλλονται τόσο η  $K_m$  όσο και η  $V_{max}$ . Είναι δυνατόν να παρατηρηθεί λοιπόν αύξηση ή μείωση στην τιμή της  $K_m$ , ενώ η τιμή της  $V_{max}$  θα μειώνεται σε κάθε περίπτωση<sup>51</sup>.

### Δ) Ασυναγώνιστη ή ανταγωνιστική αναστολή:

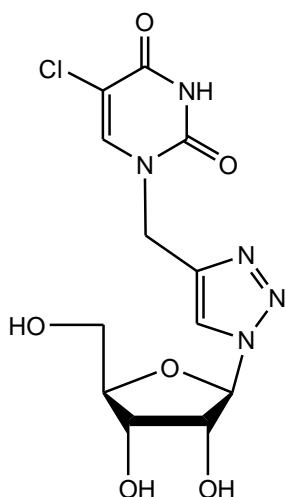
Παρ'όλο που στους προηγούμενους τύπους αναστολής οι αναστολείς μπορούν να δεσμευτούν απευθείας με το ένζυμο, στην ανταγωνιστική αναστολή δεσμεύονται αποκλειστικά στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των τιμών της  $K_m$  και  $V_{max}$ <sup>51</sup>.

## 1.7. Αναστολείς

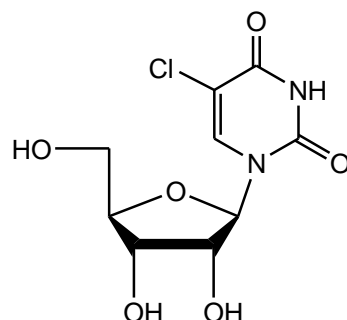
Πρόκειται για πρωτεΐνες που ανήκουν στην υπερικογένεια της ριβονουκλεάσης A, προκαλούν αρκετά παθολογικά προβλήματα στον οργανισμό. Πραγματοποιήθηκαν πολλές κρυσταλλογραφικές και κινητικές μελέτες προκειμένου να βρεθούν οι κατάλληλοι αναστολείς της RNase A. Η παγκρεατική ριβονουκλεάση A όπως αναφέρθηκε παραπάνω παρουσιάζει 36% ομολογία με την ηωσινόφιλη νευροτοξίνη ενώ το κεντρικό καταλυτικό της κέντρο (P1) είναι απόλυτα συντηρημένο με αυτό της RNase A. Επιπροσθέτως, τα περιφερειακά κέντρα σύνδεσης B1 και B2 είναι επίσης σε μεγάλο βαθμό συντηρημένα. Έτσι λοιπόν ορισμένοι από τους αναστολείς της RNase A, οι οποίοι καλύπτουν υποπεριοχές με συντηρημένα αμινοξέα και στα δυο ένζυμα, δοκιμάστηκαν και στην ηωσινόφιλη νευροτοξίνη.

Πρόσφατα έχουν μελετηθεί στην παγκρεατική ριβονουκλεάση A, μια σειρά νουκλεοζιτών, (η δράση των οποίων θα αναφερθεί παρακάτω), οι οποίοι παρουσίασαν μια πολύ ισχυρή αναστολή με σταθερές αναστολής της τάξης των  $\mu M$ . Οι νουκλεοζίτες αυτοί αποτελούνται από βάσεις πυριμιδίνης, είναι απαλλαγμένοι από φωσφορικές ομάδες, και κάποιοι από αυτούς διαθέτουν ένα τριαζολικό δακτύλιο ο οποίος αυξάνει κατά πολύ την αναστολή<sup>53</sup>.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι αναστολείς 4d και 6d (**Εικόνα 14** και **Εικόνα 15** αντίστοιχα). Ο αναστολέας 4d διαθέτει τριαζολικό δακτύλιο και όπως και ο αναστολέας 6d, έχει ως υποκαταστάτη το χλώριο. Ο 6d είναι νουκλεοσίδιο ουρακίλης και δε διαθέτει τριαζολικό δακτύλιο. Οι σταθερές αναστολής τους στη ριβονουκλεάση A είναι  $94.8 \pm 8,7$  και  $44.5 \pm 4.6$  αντιστοίχως<sup>53</sup>. Έτσι λοιπόν επειδή όπως αναφέρθηκε το ενεργό κέντρο των ριβονουκλεασών είναι υψηλά συντηρημένο, δοκιμάστηκαν και στην ηωσινόφιλη νευροτοξίνη.



**Εικόνα 14: Ο αναστολέας 4d**

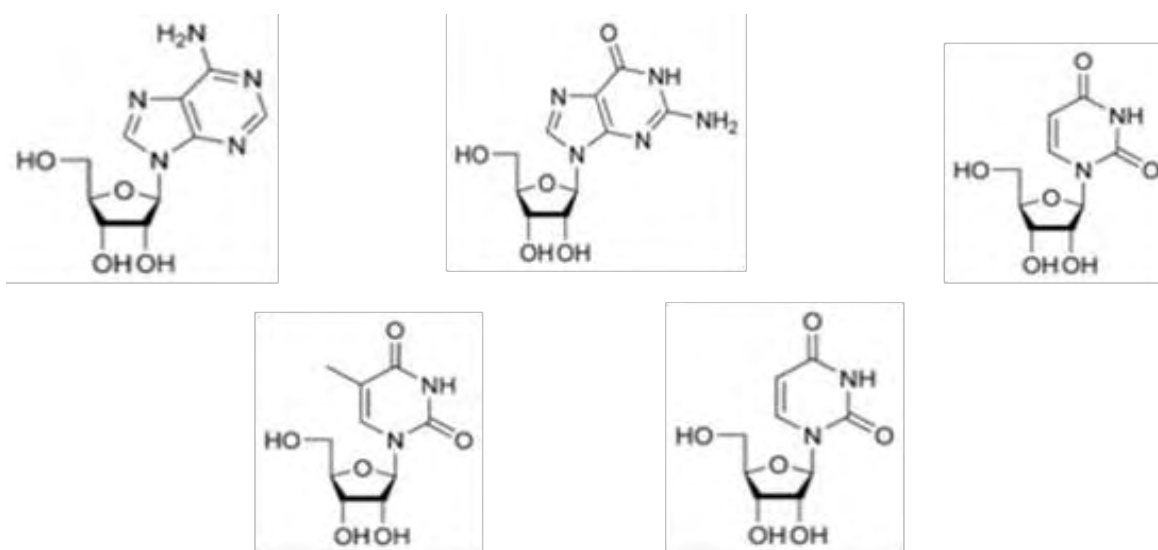


**Εικόνα 15: Ο αναστολέας 6d**

### 1.8. Νουκλεοζίτες

Μια μονάδα που αποτελείται από μία βάση δεσμευμένη σε ένα σάκχαρο ονομάζεται νουκλεοζίτης. Οι τέσσερις μονάδες νουκλεοζιτών στο RNA ονομάζονται αδενοσίνη, γουανοσίνη, κυτιδίνη και ουριδίνη, ενώ στο DNA ονομάζονται δεοξαδενοσίνη, δεοξγουανοσίνη, δεοξκυτιδίνη και θυμιδίνη. Σε κάθε περίπτωση, το N-9 μιας πουρίνης ή το N-1 μιας πυριμιδίνης συνδέεται στο C-1 του σακχάρου. Η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου όταν η δομή γράφεται με τον κλασικό τρόπο. Με άλλα λόγια, η διαμόρφωση του γλυκοζιτικού δεσμού N είναι β.

Οι νουκλεοζίτες εξαιτίας του δομικού τους ρόλου στο DNA και στο RNA, απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς μέσα στη φύση. Στην **Εικόνα 16** φαίνονται ορισμένα παραδείγματα νουκλεοζιτών:



**Εικόνα 16: Νουκλεοζίτες (αδενοσίνη, γουανοσίνη, θυμιδίνη, κυτιδίνη, ουριδίνη).**

Οι νουκλεοζίτες, καθώς και τα ανάλογά νουκλεοζιτών, χάρη στις ιδιαίτερες ιδιότητες τους, οι οποίες τους καθιστούν αντικαρκινικούς, αντιβακτηριδιακούς, αντιακούς και αντιοξειδωτικούς παράγοντες, παρουσιάζουν ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον. Συγκεκριμένα, οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους έχουν μελετηθεί ως δυνητικοί αντικαρκινικοί παράγοντες καθώς παρουσιάζουν αντικαρκινικές και κυτταροστατικές ιδιότητες. Έχει διαπιστωθεί η ικανότητα τους να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών. Ακόμη, επηρεάζουν τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς του πολλαπλασιασμού των ιών. Επιπλέον, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα έχουν επιδείξει και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, σαν ουσίες που μπορούν να επιβραδύνουν ή να αποτρέψουν την οξειδωση ενός υποστρώματος ενώ βρίσκονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το υπόστρωμα.

Είναι πλέον βέβαιο πως ένας μεγάλος αριθμός φυσικών αντιβιοτικών με σημαντική αντική και αντικαρκινική δράση περιέχουν στη δομή τους νουκλεοζίτες συνδεδεμένους με ολιγοσακχαρίτες. Προκειμένου, λοιπόν, να διερευνηθεί το φάσμα των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους, έχουν γίνει πολλές τροποποιήσεις στο τμήμα της βάσης και του σακχάρου των φυσικών νουκλεοζιτών με σκοπό να διευρυνθεί το φάσμα των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους.

### **1.9. Μηχανισμός δράσης των νουκλεοζιτών**

Η σύνθεση των φυσικών νουκλεοζιτών πραγματοποιείται μεν ενδοκυτταρικά, ωστόσο έχουν και τη δυνατότητα να εισέλθουν στα κύτταρα με παθητική διάχυση. Επίσης, τροποποιούνται ενδοκυτταρικά, έτσι ώστε να παραχθούν τα νουκλεοτιδία. Οι πολυμεράσες χρησιμοποιούν τα νουκλεοτιδία ως βασικές δομικές μονάδες του γενετικού υλικού DNA και RNA.

Χάρη στην ικανότητα για παθητική διάχυση, αξιοποιήθηκε η εν λόγω ιδιότητα για την εφαρμογή των νουκλεοζιτικών αναλόγων, δηλαδή μορίων που αποτελούν χημικά τροποποιημένες εκδόσεις των φυσικών νουκλεοζιτών, ως αντικών και αντικαρκινικών παραγόντων για τη θεραπεία πολλών ασθενειών. Τα φάρμακα, που ως δραστική ουσία έχουν κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο, επιβάλλεται να αλληλεπιδράσουν με κάποιο μοριακό στόχο προκειμένου να είναι δραστικά. Στην κατηγορία των μοριακών στόχων των νουκλεοζιτικών αναλόγων υπάγονται οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Οι πιο κοινοί τύποι πρωτεϊνών με τους οποίους αλληλεπιδρούν τα φάρμακα είναι οι υποδοχείς, οι διάλυτοι ιόντων, τα ένζυμα και τα μόρια μεταφορείς. Ο βασικός λόγος που τα νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου και του AIDS, είναι ότι μπορούν να τροποποιηθούν δομικά, έτσι ώστε να παράγουν φαρμακολογικώς ενεργά παράγωγα, τα οποία διατηρώντας τις περισσότερες από τις μεταβολικές ιδιότητες των μητρικών ενώσεων, μπορούν να μεταφερθούν μέσα στο κύτταρο και να μεταβολιστούν. Στη συνέχεια, μπορούν να παρέμβουν στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων, έτσι ώστε να

προωθήσουν είτε αντιπολλαπλασιαστικές λειτουργίες, είτε την αντίσταση στην αντιγραφή του ιού στα μολυσμένα κύτταρα .

Τα αντικαρκινικά και τα αντιαυτά ανάλογα εμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό και την επισκευή του κυτταρικού DNA και τον αναδιπλασιασμό του ιικού γενώματος. Αυτά τα θεραπευτικά ανάλογα είναι ανενεργά προφάρμακα, που εξαρτώνται από την ενδοκυττάρια φωσφορυλίωση για τη φαρμακολογική τους δράση. Αν και τα φωσφορυλιωμένα ανάλογα δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη, τα μη φωσφορυλιωμένα εισάγονται στο κύτταρο από πρωτεΐνες - μεταφορείς νουκλεοζιτών. Φωσφορυλιώνονται κατόπιν προς τις τριφωσφορικές τους μορφές από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα, και όντας ενεργά, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιικό διπλασιασμό, ή προκαλούν διαταραχές στις δεξαμενές νουκλεοτιδίων, που με τη σειρά τους παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα αλληλεπιδρούν με τις ιικές πολυμεράσες. Οι ιικές πολυμεράσες, συχνά είναι ειδικά διαμορφωμένες έτσι ώστε να αποτελούν στόχο για έναν ειδικό αντιαυτό παράγοντα. Η συγκεκριμένη μέθοδος ενίσχυσε την παραγωγή των ειδικών αντιαυτών φαρμάκων. Μιμούμενα το ρόλο των φυσικών νουκλεοζιτών, τα αντιαυτά φάρμακα νουκλεοζιτικών αναλόγων ενσωματώνονται στο ιικό γονιδίωμα από τις ιικές πολυμεράσες, κατά τη διαδικασία της αντιγραφής του γενετικού υλικού. Αυτό το γεγονός εξασθενίζει τη σύνθεση ή τη λειτουργία του ιικού γονιδιώματος που προκύπτει και επομένως καταστέλλει την αντιγραφή του ιού. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα πιθανόν να είναι κατάλληλα για τη θεραπεία χρόνιων ιικών ασθενειών. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι ως φάρμακα έχουν γενικά υψηλή εκλεκτικότητα. εξαιρετική δραστική ικανότητα και μεγάλη διάρκεια δράσης.

Επίσης τα ανάλογα των νουκλεοζιτών μπορούν να δράσουν και ως προφάρμακα, δεδομένου ότι πρέπει να φωσφορυλιωθούν στην 5' θέση του υδατάνθρακα από τις κυτταρικές κινάσες για να μπορέσουν να δράσουν κι αυτό είναι το «κλειδί» στην επιλεκτικότητά τους. Η φωσφορυλίωση των νουκλεοζιτικών αναλόγων στο κύτταρο, τα ενεργοποιεί και ανταγωνίζονται με τα φυσικά νουκλεοτίδια για τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων. Επειδή η αντιγραφή των νουκλεϊκών οξέων είναι κοινή για όλες τις μορφές ιών, τα ανάλογα νουκλεοζιτών ενδεχομένως έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στην αντιαυτή θεραπεία .

Επειδή οι φωσφορυλιωμένες ενώσεις ιονίζονται συνήθως στο σώμα λόγω του διαφορετικού pH στα διάφορα διαμερίσματα, δεν μεταφέρονται εύκολα μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Οι ενεργές μορφές των νουκλεοτιδίων αποτελούν τριφωσφορικά άλατα, με όλες τις αντικαταστάσεις φωσφορικών στην 5'-θέση από ειδικές ιικές-κινάσες που συχνά καταλύουν την πρώτη 5'-φωσφορυλίωση των νουκλεοζιτικών αναλόγων, με την επόμενη φωσφορυλίωση από τις κυτταρικές κινάσες. Η πρώτη φωσφορυλίωση που οδηγεί στο σχηματισμό του 5'-μονοφωσφορικού νουκλεοζίτη (MP) συνήθως καταλύεται από μία νουκλεοζιτική κινάση που κωδικοποιείται από το κύτταρο-ξενιστή ή τον ιό που μολύνει το κύτταρο-ξενιστή. Η μετατροπή των νουκλεοζιτών-MP προς τις αντίστοιχες 5'-διφωσφορικές

και τριφωσφορικές δομές πραγματοποιείται από νουκλεοτιδικές κινάσες, καθώς και νουκλεοζιτικές διφωσφορικές κινάσες,. Συνεπώς, τόσο οι κυτταρικές όσο και οι ιικές κινάσες διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στο μεταβολισμό και την αντιγραφή των κυττάρων και των ιών<sup>53</sup>.

### **ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας, τέθηκε αρχικά η έκφραση και ο καθαρισμός της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ηωσινοφίλης νευροτοξίνης από κύτταρα E.Coli. Έπειτα, η EDN αξιοποιήθηκε για την κινητική μελέτη παρουσία αναστολέων και για το σχηματισμό κρυστάλλων.

Η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη ανήκει στην υπερικογένεια της RNase A και ως ριβονουκλεάση, μετά από κρυσταλλογραφικές μελέτες, βρέθηκε ότι παρουσιάζει πολλές δομικές ομοιότητες με τη παγκρεατική ριβονουκλεάση A (RNase A). Όσον αφορά την παγκρεατική ριβονουκλεάση A, έχει μελετηθεί μία σειρά συνθετικών νουκλεοζιτών οι οποίοι παρουσίαζαν μία αρκετά ικανοποιητική συναγωνιστική αναστολή της τάξης των  $\mu\text{M}$  (micromollar). Ειδικότερα, διαπιστώθηκε πως οι τιμές της σταθεράς διάστασης  $K_i$  ήταν χαμηλότερες (επομένως ήταν ισχυρότερη η αναστολή) όταν ο αναστολέας είχε στο μόριο του τριαζολικό δακτύλιο, σε σχέση πάντα με τους αναστολείς που μελετήθηκαν και δεν είχαν στο μόριο τους τριαζολικό δακτύλιο<sup>53</sup>.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκε η ικανότητα αναστολής της δραστηριότητας της EDN παρουσία των αναστολέων 4d και 6d. Οι αναστολεις αυτοι, μέσω κρυσταλλογραφίας, έχει αποδειχθεί πως προσδένονται στο ενεργό κέντρο της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A, προκαλώντας σημαντική αναστολή της δράσης της<sup>53</sup>. Αυτό το αποτέλεσμα οφείλεται στη δομή των αναστολέων και σε ένα άτομο χλωρίου που είναι ο υποκαταστάτης.

Με βάση όλα τα παραπάνω, μελετήθηκε η ικανότητα αναστολή της EDN από τους αναστολείς αυτούς. Απώτερος σκοπός αποτελεί ο κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός βελτιωμένων αναστολέων του ενζύμου μικρού μοριακού βάρους η οποίοι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως φαρμακευτικά μέσα για την αντιμετώπιση των παθολογικών καταστάσεων στις οποίες εμπλέκεται η EDN.

## 2. Πειραματικό Τμήμα

### 2.1. Πλασμιδιακοί φορείς

Τα πλασμίδια είναι κατά κανόνα μικρά γενετικά στοιχεία που υφίστανται και αντιγράφονται ανεξάρτητα από τα χρωμοσώματα. Η συντριπτική πλειονότητα των πλασμιδίων αποτελούνται από δίκλωνο DNA και, ενώ τα περισσότερα είναι κυκλικά μόρια, εντούτοις υπάρχουν και ορισμένα γραμμικά. Τα πλασμίδια έχει βρεθεί ότι υπάρχουν στα περισσότερα προκαρυωτικά είδη. Πολλοί προκαρυώτες φαίνεται να περιέχουν ένα ή περισσότερα πλασμίδια, πέραν των χρωμοσωμάτων τους. Μερικά πλασμίδια περιέχουν γονίδια των οποίων τα πρωτεϊνικά προϊόντα προσδίδουν σημαντικές ιδιότητες στο κύτταρο-ξενιστή, όπως ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά.

Τα περισσότερα πλασμίδια διαθέτουν ορισμένα χαρακτηριστικά, στα οποία πλεονεκτούν σε σχέση με άλλους φορείς κλωνοποίησης και τα οποία είναι τα εξής:

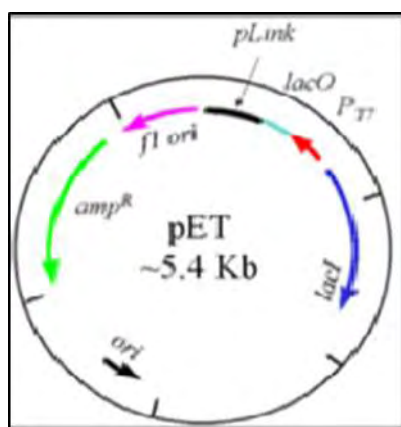
- Έχουν μικρό γονιδίωμα, εύκολο στην απομόνωση και τον χειρισμό,
- Περιέχουν ανεξάρτητη περιοχή έναρξης της αντιγραφής (ori C), προκειμένου η παραγωγή πλασμιδίου στα κύτταρα να συντελείται ανεξάρτητα από τον άμεσο χρωμοσωματικό έλεγχο,
- Περιέχουν την περιοχή του πολυσυνδέτη, μία περιοχή κατάλληλη για την εισαγωγή εξω-χρωμοσωμικού DNA με πολλαπλές θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικές ενδονουκλεάσες.
- Βρίσκονται μέσα στον οργανισμό σε πολλαπλά αντίγραφα, έτσι να είναι δυνατή η ενίσχυση του DNA τους.
- Διαθέτουν επιλέξιμους δείκτες, π.χ. γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και γονίδια αναφοράς, οι οποίοι διευκολύνουν την ανίχνευση και επιλογή κυτταρικών κλώνων με τα επιθυμητά πλασμίδια,
- Τέλος, όταν ο φορέας χρησιμοποιείται για την έκφραση κάποιου γονιδίου, τότε το πλασμίδιο διαθέτει τρεις επιπλέον περιοχές που κωδικοποιούν τον υποκινητή (P), τον χειριστή (O) και τον καταστολέα (I) του υποκινητή.

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pET11c της εταιρίας Novagen (**Εικόνα 17**) για την κλωνοποίηση της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης. Ο φορέας αυτός αποτελείται από:

1. το γονίδιο lacI που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη καταστολέα lac,
2. τον υποκινητή T7, ο οποίος είναι ειδικός για την T7 (μη βακτηριακή) RNA πολυμεράση και η οποία δεν εντοπίζεται στο βακτηριακό γονιδίωμα,
3. τον χειριστή lac, ο οποίος μπορεί να εμποδίσει τη μεταγραφή,
4. την περιοχή του πολυσυνδέτη, στην οποία ενσωματώνεται το γονίδιο της EDN,



5. τον παράγοντα f1 (origin of replication),
6. ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικικιλίνη.



Εικόνα 17: Ο πλασμιδιακός φορέας pET11c.

## 2.2. Η Escherichia Coli ως κύτταρο ξενιστής

Τα μέλη του γένους E.coli είναι αρνητικά κατά Gram, ραβδόμορφα, χημειοετερότροφα και προαιρετικά αερόβια βακτήρια. Εντοπίζονται στο εντερικό σύστημα του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων και πιθανότατα έχουν κάποιο ρόλο στη θρέψη μέσω σύνθεσης βιταμινών, ιδιαίτερα βιταμίνης K. Τα περισσότερα στελέχη της E.coli είναι ακίνδυνα για τον οργανισμό. Ωστόσο, ορισμένα στελέχη είναι παθογόνα και συνδέονται με την εμφάνιση τροφικών δηλητηριάσεων στον οργανισμό. Η E.coli είναι ένα μεσόφιλο που αναπτύσσεται άριστα σε θερμοκρασία 37 °C και για την ανάπτυξή του είναι αναγκαία η παρουσία οργανικών ενώσεων, αζώτου, θείου και αλάτων στο θρεπτικό υπόστρωμα.

Η E. Coli είναι το συνηθέστερο βακτηριακό είδος που χρησιμοποιείται για την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, λόγω των παρακάτω πλεονεκτημάτων:

- Έχουν διαλευκανθεί πλήρως τα βιοχημικά και γενετικά χαρακτηριστικά της, με αποτέλεσμα ο χειρισμός της να είναι εύκολος για τους ερευνητές.
- Καλλιεργείται εύκολα με αρκετά οικονομικό εργαστηριακό εξοπλισμό.
- Είναι διαθέσιμοι ποικίλοι συμβατοί φορείς DNA και στελέχη-ξενιστές, οδηγώντας έτσι στη βελτιστοποίηση της έκφρασης με βάση τις εκάστοτε ανάγκες της πειραματικής διεργασίας.
- Προσφέρουν δυνατότητα τροποποίησης των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων προκειμένου να εκφραστεί το επιθυμητό γονίδιο και να παραχθεί η εξεταζόμενη πρωτεΐνη.

Όσον αφορά τα προβλήματα που προκύπτουν από την έκφραση πρωτεϊνών στην E.coli, παρατηρείται η απουσία συστήματος για τις απαραίτητες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και η δυσκολία στην απομόνωση-καθαρισμό του προϊόντος λόγω διατήρησης των πρωτεϊνών στον περιπλασματικό χώρο.

Τα πλεονεκτήματα, ωστόσο, υπερτερούν των μειονεκτημάτων, με αποτέλεσμα την ευρεία χρήση της στον τομέα της κλωνοποίησης. Στο εμπόριο είναι διαθέσιμα λοιπόν, πάρα πολλά διαφορετικά βακτηριακά στελέχη E. coli, που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τις ιδιότητες που τους έχουν προσδώσει οι κατασκευαστές τους. Στην παρούσα πειραματική εργασία χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος B834, το οποίο έχει το εξής γονιδίωμα:

F<sup>+</sup>omp T hsdS<sub>B</sub>(r<sub>b</sub><sup>-</sup>m<sub>b</sub><sup>-</sup>) gal dcm met (DE3) p LysS (cam<sup>R</sup>)

### **2.3 Καλλιέργεια κυττάρων E. Coli**

#### **2.3.1 Γενικές πληροφορίες**

Με τον όρο καλλιέργεια κυττάρων περιγράφεται η ανάπτυξη συγκεκριμένου στελέχους ή είδους οργανισμού σε εργαστηριακό θρεπτικό μέσο.

Όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται εργαστηριακά, οι ερευνητές παρεμβαίνουν και σταματούν την ανάπτυξή τους στην εκθετική φάση, όπου τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται εκθετικά και θεωρούνται πλήρως ενεργά όσον αφορά το μεταβολισμό τους. Έτσι εξασφαλίζεται η κατά δύναμιν μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης. Ο προσδιορισμός της φάσης στην οποία βρίσκεται η καλλιέργεια των κυττάρων γίνεται μέσω φασματοφωτομέτρησης στα 600nm σε τακτά χρονικά διαστήματα, όπου μετριέται σε ειδική κυψελίδα η οπτική πυκνότητα 1 ml καλλιέργειας, έτσι ώστε η οπτική απορρόφηση να μην υπερβεί την τιμή 0,6-0,8. Ο εμβολιασμός όλων των καλλιεργειών γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και η επώαση στους 37 °C.

### **2.3.2 Παρασκευή θρεπτικών μέσων για τις καλλιέργειες**

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα θρεπτικά υποστρώματα των καλλιεργειών.

Για τη δημιουργία των μικρών καλλιεργειών:

- Προετοιμασία θρεπτικού υλικού LB (Lysogeny Broth) - Άγαρ

Χρησιμοποιήθηκε το LB-Άγαρ, το οποίο διατίθεται στο εμπόριο σε μορφή σκόνης.

- Για την παρασκευή 200 ml LB και γνωρίζοντας πως για 1 L καλλιέργειας απαιτούνται 25g LB, ζυγίζουμε 5g LB από το stock.
- Ακολουθεί ανάδευση του διαλύματος.
- Το LB αποστειρώνεται και φυλάσσεται στο ψυγείο.

Για τη δημιουργία μεγάλων καλλιεργειών:

- Προετοιμασία θρεπτικού υλικού TB (Terrific Broth)

Παρασκευάστηκε 1L TB medium (Terrific Broth). Η διεργασία παρασκευής ήταν η εξής:

- Διάλυση 12g Tryptone και 24g Yeast Extract σε 800ml ddH<sub>2</sub>O.
- Προσθήκη 4ml glycerol και συμπλήρωση με ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 900ml.
- Διάλυση 12,54g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> και 2,31g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> σε 100ml ddH<sub>2</sub>O.
- Ανάμιξη των δύο διαλυμάτων μέχρι τον τελικό όγκο (1 L).
- Σε δύο κωνικές φιάλες του 1L, προσθέτω από 500ml του θρεπτικού TB medium που παρασκευάστηκε.
- Ακολουθεί αποστείρωση των δύο κωνικών φιαλών και αποθήκευση στο ψυγείο.

### **2.3.3 Χρήση αντιβιοτικών ως επιλεκτικά μέσα καλλιέργειας**

Ο πιο διαδεδομένος τρόπος επιλογής μετασχηματισμένων βακτηρίων, αλλά και μία μέθοδος για την αποφυγή της ανάπτυξης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών σε μία κυτταρική καλλιέργεια, είναι η προσθήκη αντιβιοτικών. Έτσι, εξασφαλίζεται η ανάπτυξη μόνο των μετασχηματισμένων βακτηρίων, καθώς η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά

προσδίδεται συνήθως με την ύπαρξη κατάλληλων γονιδίων στο πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε.

Το αντιβιοτικό είναι μια χημική ένωση που παράγεται από έναν μικροοργανισμό και προκαλεί τον θάνατο ή την αναστολή της ανάπτυξης κάποιου άλλου μικροοργανισμού. Ομαδοποιούνται με βάση τη χημική δομή ή τον τρόπο δράσης τους στα βακτήρια, ο οποίος μπορεί να είναι:

- Παρεμπόδιση σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος στα βακτήρια
- Καταστροφή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης
- Παρεμπόδιση των βιοσυνθετικών πορειών της πρωτεϊνοσύνθεσης
- Παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης νουκλεϊκών οξέων

Η ποσότητα και το είδος του αντιβιοτικού καθορίζονται από το είδος του μικροοργανισμού, και κατ'έκταση το βακτηριακό στέλεχος, και τον τύπο του πλασμιδίου που χρησιμοποιούνται σε κάθε πείραμα.

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε το αντιβιοτικό Αμπικιλίνη (Amp), το οποίο ανήκει στην κατηγορία των β-λακταμών και δρα παρεμποδίζοντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Συγκεκριμένα, αποτελεί ημισυνθετική πενικιλίνη με διευρυμένο φάσμα αντιβιοτικής δραστηριότητας, στο οποίο περιλαμβάνονται και ορισμένα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Οι δομικές διαφορές στις N-ακυλομάδες επιτρέπουν σε αυτές τις ημισυνθετικές πενικιλίνες να διαπερνούν την εξωτερική μεμβράνη των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και να αναστέλλουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος<sup>30</sup>. Η στρατηγική που ακολουθούν τα ανθεκτικά στελέχη για την επιβίωσή τους, είναι η απενεργοποίηση του αντιβιοτικού μέσω της παραγωγής του ενζύμου β-λακταμάση, η οποία εκκρίνεται στον περιπλασμικό χώρο και καταλύει την υδρόλυση του β-λακταμικού δακτυλίου του μορίου της αμπικιλίνης. Το γονίδιο bla που κωδικοποιεί τη β-λακταμάση βρίσκεται στα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν και έτσι, μετά από έναν μετασχηματισμό σε καλλιέργεια που περιέχει amp, επιβιώνουν μόνο εκείνα τα στελέχη E. Coli, τα οποία έχουν προσλάβει τα πλασμίδια αυτά.

Να τονιστεί ότι πριν τη χρήση της η amp, όπως και όλα τα αντιβιοτικά, αποστειρώνεται με διήθηση μέσω φίλτρου μεγέθους πόρων 0,22 µm και αποθηκεύεται στους -20 °C (stock solutions).

#### **2.3.4. Πρωτόκολλο καλλιέργειας κυττάρων για παραγωγή EDN**

Στην παρούσα πειραματική εργασία, η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε αρχικά σε δύο μικρές υγρές καλλιέργειες (των 5ml) και κατόπιν σε δύο μεγάλες καλλιέργειες (των 500ml).

##### **Παρασκευή μικρών καλλιιεργειών**

Σε δύο αποστειρωμένα falcon προστίθενται από:

- 5ml θρεπτικού LB
- 20µl amp 0,4g/ml (αρχικής συγκέντρωσεως 100 mg/ml και κατ'επέκταση τελικής συγκέντρωσεως 0,4 mg/ml σε τελικό όγκο 5ml).

Ακολουθεί ο εμβολιασμός από stock κυττάρων E.coli (με ετερόλογο φορέα ενσωματωμένο), που ονομάζεται glycerol stock, καθώς εκτός από τα κύτταρα περιέχει και γλυκερόλη ώστε να φυλάσσεται στους -80 °C. Τέλος, τα κύτταρα επωάζονται στους 37 °C για 16h υπό ήπια ανάδευση, στα 250 rpm.

##### **Παρασκευή μεγάλων καλλιιεργειών**

Αρχικά, φυλάσσεται σε μία κυψελίδα 1ml αποστειρωμένου T.B. medium, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί ως τυφλό στη διαδικασία της φασματοφωτομέτρησης. Έπειτα, οι δύο αποστειρωμένες κωνικές φιάλες που περιέχουν το θρεπτικό TB medium, εμβολιάζονται με 5ml μικρής καλλιέργειας, η καθεμία. Στη συνέχεια, προστίθενται 500µl amp σε κάθε κωνική φιάλη και ακολουθεί επώαση των δύο μεγάλων υγρών καλλιιεργειών στους 37 °C και υπό 210 rpm, μέχρι η οπτική απορρόφηση στα 600 nm να κυμαίνεται μεταξύ 0,6 και 0,8 ( $OD_{600} = 0,6-0,8$ ).

Στην παρούσα εργασία, η επώαση διήρκτησε περίπου 7h, καθώς μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος η  $OD_{600}$  πήρε τις επιθυμητή τιμή 0,575, καθώς τα βακτήρια βρίσκονταν στην εκθετική φάση ανάπτυξης.

Να τονιστεί, ότι τόσο η παρασκευή των μικρών και μεγάλων καλλιέργειών όσο και η φασματοφωτομέτρηση, γίνονται σε στείρες συνθήκες και παρουσία αυτόκαυστου. Χρησιμοποιούνται αποστειρωμένα υλικά και σκεύη, και το πείραμα διεξάγεται σε πάγκους οι οποίοι έχουν καθαριστεί με αιθανόλη.

#### **2.4 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων**

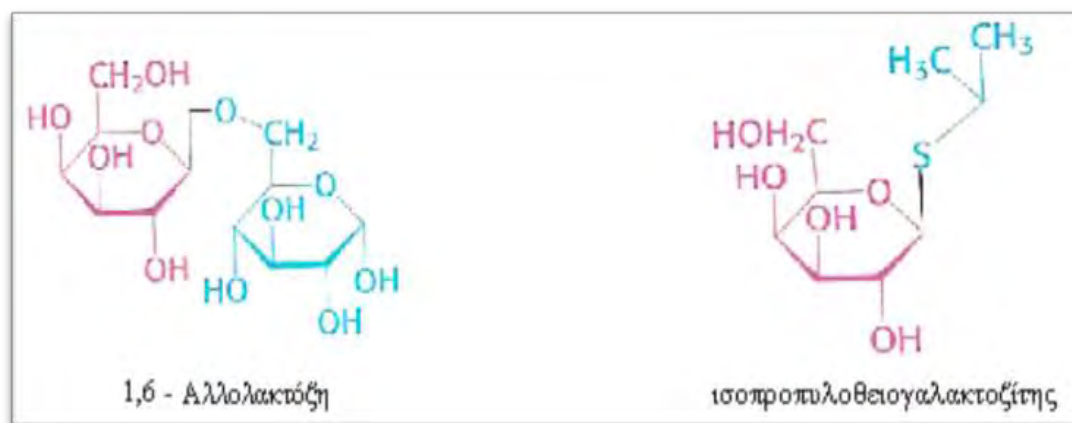
Ως μετασχηματισμός αναφέρεται η διαδικασία εισαγωγής εξωγενούς γενετικού DNA σε βακτήρια-δέκτες και αποτελεί το σημαντικότερο βήμα της κλωνοποίησης. Κατά τη διαδικασία αυτή, γίνεται επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων μέσω επίστρωσης τους σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο, στο οποίο υπάρχει ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Από αυτή τη δοκιμασία, θα επιζήσουν μόνο εκείνα τα κύτταρα που περιέχουν τα πλασμίδια, στα οποία βρίσκεται και το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό. Από τη διαίρεση κάθε ανθεκτικού βακτηριακού κυττάρου προκύπτει μία αποικία βακτηρίων. Τα βακτήρια κάθε αποικίας έχουν προέλθει από ένα μόνο κύτταρο, το οποίο περιέχει ένα μόνο μόριο ανασυνδυασμένου DNA. Τελικά, προκύπτει μία βιβλιοθήκη μέσω του πολλαπλασιασμού του συνόλου των ανασυνδυασμένων τμημάτων DNA στο εσωτερικό των βακτηρίων<sup>31</sup>.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, ο μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε με τοποθέτηση μικρής ποσότητας του πλασμιδιακού φορέα (2μl) σε βακτηριακά κύτταρα B834, τα οποία αφέθηκαν στον πάγο για 30min. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, τα κύτταρα και το πλασμίδιο μεταφέρθηκαν στη συσκευή heat-block στους 42°C για 35sec.

#### **2.5 Επαγωγή**

Για την παραγωγή της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης, χρησιμοποιήθηκε ως επαγωγέας η ένωση IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) ή ισοπροπυλοθειογαλακτοζίτης. Ο IPTG είναι χρήσιμος στην εργαστηριακή έρευνα ως εργαλείο για την επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης, καθώς αποτελεί ανάλογο της λακτόζης και είναι ισχυρός επαγωγέας της έκφρασης της β-γαλακτοζιτάσης. Δεν αποτελεί υπόστρωμα του ενζύμου και έτσι δεν καταβολίζεται, εξασφαλίζοντας συνεχή επαγωγή.

Έχει την ικανότητα λοιπόν να αδρανοποιεί τον καταστολέα lac, επιτρέποντας έτσι την διεξαγωγή της γονιδιακής έκφρασης. Το IPTG εμφανίζει δομικές ομοιότητες με την αλλολακτόζη (**Εικόνα 18**), ένα παραπροϊόν της αντίδρασης της β-γαλακτοζιτάσης που παράγεται σε χαμηλά επίπεδα από τα λίγα μόρια της β-γαλακτοζιτάσης που υπάρχουν πριν από την επαγωγή και η οποία δρα ως επαγωγέας του οπερονίου lac. Έτσι εξηγείται η χρήση της συγκεκριμένης ένωσης ως επαγωγέα, για την αύξηση στην έκφραση πρωτεϊνών.



**Εικόνα 18:** Η χημική δομή της 1,6-αλλολακτόζης και του IPTG

Επιπλέον, ένα πλεονέκτημα του IPTG που καθιστά συχνή τη χρήση του στις πειραματικές διαδικασίες είναι ότι η E.coli αδυνατεί να υδρολύσει και γενικά να καταβολίσει την ένωση αυτή, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση της να παραμένει σταθερή σε όλη τη διαδικασία της κυτταρικής αντιγραφής.

Όσον αφορά τη δράση του IPTG, όπως και η αλλολακτόζη, συνδέεται με τον καταστολέα lac και απελευθερώνει τον τετραμερή καταστολέα από το χειριστή lac με αλλοστερικό τρόπο, επιτρέποντας έτσι τη μεταγραφή των γονιδίων, όπως είναι το γονίδιο της β-γαλακτοζιδάσης, στο οπερόνιο lac. Σε αντίθεση όμως με την αλλολακτόζη, το IPTG περιέχει ένα μόριο θείου στο μόριο του το οποίο δημιουργεί έναν χημικό δεσμό, μη-υδρολύσιμο από το κύτταρο, εμποδίζοντας έτσι το κύτταρο να μεταβολίσει την ένωση. Συνεπώς, η συγκέντρωση του IPTG παραμένει σταθερή και η έκφραση των γονιδίων που ελέγχονται από το συγκεκριμένο οπερόνιο δεν αναστέλλεται κατά τη διάρκεια του πειράματος. Όσον αφορά την πρόσληψη του IPTG από τα κύτταρα E.coli, έχει βρεθεί ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις εισέρχεται στα κύτταρα μέσω της περμεάσης της λακτόζης, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να εισέλθει στα κύτταρα ανεξάρτητα από την περμεάση, όπως συμβαίνει

στις περιπτώσεις επαγωγής. Συμπεραίνουμε δηλαδή, ότι η επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης παρατηρείται σε υψηλές συγκεντρώσεις IPTG.

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, μόλις η τιμή της OD<sub>600</sub> φτάσει στο επιθυμητό επίπεδο, προστίθεται ο επαγωγέας IPTG. Η τελική συγκέντρωση του επαγωγέα που προστέθηκε στις κωνικές φιάλες με τις μεγάλες υγρές καλλιέργειες, ήταν 1 mM, δηλαδή προσθέσαμε 1 ml επαγωγέα. Μετά την προσθήκη του επαγωγέα, ακολούθησε επώαση για 4h στις ίδιες συνθήκες όπου έγινε η καλλιέργεια των κυττάρων, δηλαδή στους 37 °C υπό ανάδευση στις 250 rpm . Μετά το πέρας των 4h, τα κύτταρα βγαίνουν από τον επωαστήρα και φυλάσσονται στο ψυγείο.

## **2.6. Συλλογή των κυττάρων**

Οι παραγόμενες πρωτεΐνες μπορούν να εντοπιστούν είτε στο κυτταρικό ίζημα είτε στο υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρηση της καλλιέργειας σε μεγάλες ταχύτητες. Οι εξωκυτταρικές πρωτεΐνες εντοπίζονται στο υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης μαζί με το θρεπτικό υλικό, ενώ οι σχετιζόμενες με την κυτταρική μεμβράνη και οι ενδοκυτταρικές εντοπίζονται στο κυτταρικό ίζημα.

Η EDN είναι μια μη-διαλυτή ενδοκυτταρική πρωτεΐνη και έτσι, μετά το τέλος της επαγωγής, εντοπίζεται στο κυτταρικό ίζημα. Σημειώνεται ότι το υπερκείμενο που απορρίπτεται, θα πρέπει να είναι διαυγές ως ένδειξη ότι έχουν καταβυθιστεί όλα τα κύτταρα. Σε αντίθετη περίπτωση, η φυγοκέντρηση θα πρέπει να επαναληφθεί.

Πραγματοποιείται λοιπόν φυγοκέντρηση στους 4°C και στις 5000 rpm για 20min, προκειμένου να καθιζάνουν τα κύτταρα. Το κυτταρικό ίζημα συλλέγεται για περαιτέρω επεξεργασία ή αποθηκεύεται στους -20°C.



## **2.7. Λύση των κυττάρων**

Η λύση των κυττάρων είναι ένα κρίσιμο στάδιο σε κάθε πορεία απομόνωσης καθώς είναι σε θέση να επηρεάσει τόσο την συνολική ποσότητα όσο και τη βιολογική ενεργότητα της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Η λύση των κυττάρων μπορεί να επιτευχθεί με τρεις τρόπους: ενζυμικά, μηχανικά ή μέσω εφαρμογής οσμωτικής πίεσης. Στο πείραμα αυτό, πραγματοποιήθηκε μηχανική λύση των κυττάρων, που έγινε μέσω υπερήχων.

Το κυτταρικό ίζημα που συλλέγεται επαναδιαλύεται σε lysis buffer κι έπειτα πραγματοποιείται η λύση των κυττάρων. Το Lysis Buffer αποτελείται από δύο επιμέρους διαλύματα, Α και Β, η σύσταση των οποίων είναι η ακόλουθη:

### ***Διάλυμα Α (V=100ml, pH=8)***

- Αναστολέα πρωτεασών PMSF 1mM (από stock 0,1% w/v) για την αποφυγή τυχόν πρωτεόλυσης.
- 0,1% w/v μη ιονικό απορρυπαντικό Triton X-100 για την διαλυτοποίηση της κυτταρικής μεμβράνης.
- 2 mM EDTA - χηλικός παράγοντας που δεσμεύει ιόντα απαραίτητα για τη δράση των πρωτεασών.
- 10 mM Tris-HCl - ρυθμιστικό διάλυμα για τη διατήρηση του pH σε κατάλληλη τιμή (pH=8).

### ***Διάλυμα Β (V=10ml)***

- 4% w/v Sodium Deoxycholate που διαταράσσει και αποτρέπει τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις.

Τα ιζήματα των κυττάρων (pellet) διαλυτοποιούνται με το διάλυμα Α του lysis buffer. Η διαλυτοποίηση γίνεται με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου και χρησιμοποιείται τόσος όγκος διαλύματος Α όσος χρειάζεται, προκειμένου να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή διαλυτοποίηση των ιζημάτων. Όλη η διαδικασία γίνεται στον πάγο (0 °C). Στη συνέχεια, προστίθεται σε κάθε falcon 1ml Διαλύματος Β κι ακολουθεί επώαση για 10min στο cold-room, μέσα σε πάγο. Έπειτα, γίνεται προσθήκη 40mgρ λυσοζύμης, η οποία χρησιμοποιείται για τη διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων των βακτηρίων μέσω υδρόλυσης των β (1-4) γλυκοζιτικών δεσμών ανάμεσα στα κατάλοιπα N-ακέτυλο-μουραμικού οξέος (NAM) και N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνης (NAG) σε κάποιους πολυσακχαρίτες. Τέλος, προστίθενται

2μl βενζονάσης σε κάθε falcon. Το βήμα αυτό πραγματοποιείται προκειμένου να επιτευχθεί ικανοποιητικότερη λύση των κυττάρων.

Μετά το βήμα αυτό, τα κύτταρα παραμένουν για 15min στο cold-room (4 °C) υπό ήπια ανάδευση.

Ακολουθεί το σπάσιμό τους με υπερήχους (για 4 κύκλους). Το διάλυμα υφίσταται την επίδραση υπερήχων ανά 30 δευτερόλεπτα με ενδιάμεσες παύσεις των 30 δευτερολέπτων μέχρι να προκύψει ομοιογενές διάλυμα. Η λύση των κυττάρων γίνεται σε χαμηλή θερμοκρασία (διατήρηση σε πάγο) για την αποφυγή υπερθέρμανσης που θα οδηγήσει σε καταστροφή των πρωτεϊνών. Επίσης, απαραίτητη προϋπόθεση, είναι η διαδικασία να πραγματοποιηθεί στον απαγωγό με κλειστό τζάμι διότι μπορεί να προκαλέσει τύφλωση ή και κώφωση. Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο αφρός στην επιφάνεια του διαλύματος μετά τη χρήση υπερήχων αποτελεί ένδειξη διάσπασης των κυττάρων.

Τέλος, τα κύτταρα φυγοκεντρούνται για 1h, στους 4 °C στις 10.000 rpm και μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης κρατάμε και πάλι το ίζημα, γιατί όπως έχουμε προαναφέρει η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη είναι μια μη διαλυτή πρωτεΐνη. Έτσι, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα φυλάσσεται στους -20 °C.

## **2.8. Πλύση των κυττάρων & Ομογενοποίηση**

Το κυτταρικό ίζημα που συλλέχθηκε στο προηγούμενο βήμα, επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (wash buffer) σε τρεις διαδοχικές φυγοκεντρήσεις, οι οποίες πραγματοποιούνται στις εξής συνθήκες: θερμοκρασία 4 °C, 1h στις 9200g. Μετά το τέλος κάθε φυγοκέντρωσης, τα υπερκείμενα απορρίπτονται και τα κυτταρικά ιζήματα, ομογενοποιούνται με την ειδική συσκευή ομογενοποίησης. Η διαδικασία πρέπει να γίνεται σε πάγο και να μη ξεπερνά τα 5-6 min.

Η σύσταση του διαλύματος πλύσης (V=500ml, pH=8) είναι η εξής:

- 50 Mm Tris-HCl
- 2 Mm EDTA
- 0,3 M NaCl

Διαχωρίζουμε το διάλυμα πλύσης (500 ml) σε δύο επιμέρους διαλύματα. Στο ένα διάλυμα (300 ml) προστίθεται Triton 0,1% w/v ενώ στο άλλο διάλυμα (200 ml)

δεν προστίθεται Triton. Προσθέτουμε έπειτα 50 ml του διαλύματος πλύσης με Triton σε κάθε φάλλον που περιέχει το ίζημα.

Η διαδικασία των πλύσεων είναι η παρακάτω και για την κάθε φυγοκέντρωση ισχύει: 1h, 40C και 9200g

□ 1η φυγοκέντρωση → πλύση με Triton και ομογενοποίηση.

- Λήψη του ιζήματος, και επαναδιάλυση με διάλυμα πλύσης με Triton σε κάθε φάλλον που περιέχει το ίζημα.

□ 2η φυγοκέντρωση → πλύση με Triton και ομογενοποίηση.

- Λήψη του ιζήματος, και επαναδιάλυση με το διάλυμα πλύσης με Triton σε κάθε φάλλον που περιέχει το ίζημα.

□ 3η φυγοκέντρωση → πλύση με Triton και ομογενοποίηση.

- Λήψη του ιζήματος, και επαναδιάλυση με το διάλυμα πλύσης χωρίς Triton σε κάθε φάλλον που περιέχει το ίζημα.

□ 4η φυγοκέντρωση → πλύση χωρίς Triton και ομογενοποίηση.

Η τελευταία πλύση του ιζήματος είναι προαιρετική αλλά πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο προκειμένου να διασφαλιστεί η απομάκρυνση του Triton από τα κύτταρα, για τις μεμβράνες των οποίων είναι τοξικό.

Μετά το πέρας όλων των φυγοκεντρήσεων, κρατήθηκαν τα κυτταρικά ιζήματα και φυλάχθηκαν στους -20 °C. Αυτό το βήμα πραγματοποιήθηκε προκειμένου να σπάσουν τα inclusion bodies, οι ειδικές δομές, δηλαδή, που σχηματίζουν ορισμένες πρωτεΐνες, τα μόρια των οποίων αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και εγκλείονται μέσα σε φωσφολιπίδια. Μέσα σε αυτά, βρίσκεται η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη. Το ίζημα λοιπόν, θα πρέπει να αποκτήσει μια κρεμώδη υφή που μαρτυρά ότι τα inclusion bodies διασπάστηκαν πλήρως.

## **2.9. Εγκλεισμός της πρωτεΐνης**

Το κυτταρικό ίζημα που συλλέχθηκε στο προηγούμενο στάδιο, επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα εγκλεισμού (incubation buffer) με τη βοήθεια του ομογενοποιητή.

Η σύσταση του διαλύματος εγκλεισμού ( $V=15\text{ml}$ ,  $\text{pH}=8,5$ ) είναι η εξής:

- 6 M guanidine hydrochloride
- 0,1 M Tris
- 80 mM reduced GSH
- 2 mM EDTA

Κατόπιν, το μείγμα του κυτταρικού ιζήματος με το διάλυμα εγκλεισμού τοποθετήθηκε στην συσκευή roller για 3h σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να γίνει ο εγκλεισμός. Έπειτα, μετρούμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα με τη μέθοδο Bradford.

Είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί φυγοκέντρωση πριν την ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης, στους  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  και στις  $18,500\text{ rpm}$ , για  $10\text{-}15\text{ min}$ . Το βήμα αυτό πραγματοποιείται έτσι ώστε να διαυγάσει το διάλυμα και συλλεχθεί το υπερκείμενο. Ωστόσο, στη συγκεκριμένη περίπτωση παρακάμφθηκε το βήμα αυτό, επειδή υπήρχε μεγάλος κίνδυνος απώλειας σημαντικής ποσότητας πρωτεΐνης.

## **2.10. Ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης- Μέθοδος Bradford**

Η μέτρηση της ποσότητας της πρωτεΐνης πραγματοποιείται είτε με φωτομέτρηση στο UV είτε με τη μέθοδο Bradford. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford, η οποία στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Το σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης απορροφά στα  $595\text{ nm}$ . Η μέθοδος αυτή είναι απλή, γρήγορη και ευαίσθητη γιατί επιτρέπει τον προσδιορισμό μέχρι και  $1\text{mg}$  πρωτεΐνης.

Η εκτίμηση της συγκέντρωσης γίνεται συγκρίνοντας την απορρόφηση του δείγματος στα  $595\text{ nm}$  με μια πρότυπη καμπύλη που σχετίζει τη συγκέντρωση γνωστών διαλυμάτων της πρωτεΐνης BSA με την απορρόφησή τους στα  $595\text{ nm}$ . Με βάση τη μέθοδο αυτή, κατασκευάστηκαν τα παρακάτω διαλύματα (**Πίνακας 2**).

Τα διαλύματα αυτά επωάστηκαν στο σκοτάδι, αφού το αντιδραστήριο Bradford είναι ευαίσθητο στο φως, για 5min και στη συνέχεια φωτομετρήθηκαν στα 595nm. Με βάση τις οπτικές απορροφήσεις, κατασκευάζεται μία καμπύλη, η εξίσωση της οποίας μας δίνει την ποσότητα της υπό μελέτη πρωτεΐνης που βρίσκεται μέσα στα κλάσματα. Το βήμα αυτό θεωρείται απαραίτητο για την εκτίμηση της ποσότητας η οποία πρέπει να φορτωθεί στο gel ηλεκτροφόρησης.

***Πίνακας 2: Τα διαλύματα που κατασκευάστηκαν για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης Bradford.***

| <i>mg/ml BSA</i> | <i>BSA (stock -20°C [(10mg/ml)])</i> | <i>Διάλυμα Εγκλεισμού</i> | <i>Αντιδραστήριο Bradford</i> |
|------------------|--------------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| <b>Τυφλό</b>     | -                                    | 20 μl                     | 980 μl                        |
| <b>0,2</b>       | 0,4μl                                | 19,6 μl                   | 980 μl                        |
| <b>0,4</b>       | 0,8μl                                | 19,2 μl                   | 980 μl                        |
| <b>0,6</b>       | 1,2μl                                | 18,8 μl                   | 980 μl                        |
| <b>0,8</b>       | 1,6μl                                | 18,4 μl                   | 980 μl                        |
| <b>1,00</b>      | 2μl                                  | 18 μl                     | 980 μl                        |
| <b>1,2</b>       | 2,4μl                                | 17,6 μl                   | 980 μl                        |

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό δείγματος άγνωστης συγκέντρωσης αναμιγνύουμε 980μl του αντιδραστηρίου Bradford με 20μl πρωτεΐνης ώστε στην κυψελίδα να υπάρχουν 2-10 mg πρωτεΐνης. Παρασκευάστηκε, ένα επιπλέον διάλυμα (διάλυμα 7) στο οποίο βρισκόταν η EDN. Στο δείγμα αυτό υπήρχαν τα εξής: 15μl Buffer, 5μl EDN και 980μl αντιδραστηρίου Bradford.




Όπως γίνεται κατανοητό, η αραιώση του συγκεκριμένου δείγματος ήταν 4:1. Η αραιώση αυτή έγινε καθώς το δείγμα ήταν ιδιαίτερα πυκνό και σε μικρότερη αραιώση η τιμή της οπτικής απορρόφησης θα ήταν εκτός των ορίων των οπτικών απορροφήσεων των διαλυμάτων που αναγράφονται στον πίνακα.

Με βάση την εξίσωση που προέκυψε από τις  $OD_{595}$ , βρέθηκε ότι η ποσότητα της EDN που βρίσκονταν μέσα στο διάλυμα ήταν 3,48 mg/ml.

### **2.11 Αναδίπλωση της πρωτεΐνης (refolding)**

Ο υπολογισμός του τελικού όγκου του διαλύματος της αναδίπλωσης (refolding buffer) που χρησιμοποιούμε, υπολογίζεται με βάση τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης που βρέθηκε πως υπάρχει μέσα στο διάλυμα (μέσω της μεθόδου Bradford) , ώστε τελικά η συγκέντρωσή της να μειωθεί και να φτάσει σε 0,15 mg/ml. Με βάση την αρχική συγκέντρωση της EDN (3,48 mg/ml), τον αρχικό όγκο του διαλύματος στον οποίον αυτή βρισκόταν (15 ml) και την τελική συγκέντρωση στην οποία έπρεπε να μεταβεί (0,15 mg/ml), υπολογίστηκε ότι έπρεπε να παρασκευαστούν 348 ml refolding buffer.

Η σύσταση του διαλύματος αναδίπλωσης ( $V=348$  ml,  $pH=8,5$ ) είναι η εξής:

-  0,1 M Tris-acetate
-  0,5 M L-arginine
-  0,85 mM GSSG (oxidized GSH)

Σημειώνεται ότι ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του GSSH γίνεται με βάση τον τύπο  $GSH/GSSH= 4/1$ . Ωστόσο, στην παρούσα εργασία η αναλογία που χρησιμοποιήσαμε ήταν  $GSH/GSSH= 7/1$  .

Η πρωτεΐνη αφήνεται με τη χρήση πουάρ να πέφτει σταγόνα-σταγόνα στα 348 ml διαλύματος αναδίπλωσης. Το refolding buffer σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας ήταν πάνω σε stirrer και αναδεύονταν με μαγνητάκι. Η αναδίπλωση έλαβε χώρα στο cold-room ( $4^{\circ}C$ ) και διήρκησε 72h. Αυτό το χρονικό διάστημα είναι απαραίτητο προκειμένου να μπορέσει η πρωτεΐνη να αναδιπλωθεί σωστά και να σχηματίσει τους τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς που επιθυμούμε. Για τον λόγο αυτό, είναι εξαιρετικά σημαντικό να πέφτει η πρωτεΐνη με πολύ αργό ρυθμό μέσα στο διάλυμα αναδίπλωσης.

## **2.12. Συμπύκνωση της πρωτεΐνης**

Πριν ακόμα ξεκινήσουμε τη διαδικασία της συμπύκνωσης, ρυθμίζουμε το pH του διαλύματος στο οποίο έχει ήδη πραγματοποιηθεί η αναδίπλωση, σε τιμή pH=5 και ακολουθεί φυγοκέντρωση στους 4 °C, 5.000 g για 10 min. Σκοπός είναι να καθιζάνουν όλα τα αδιάλυτα στοιχεία ,οι πρωτεΐνες που δεν είναι διαλυτές σ' αυτό το pH και η μη σωστά αναδιπλωμένη EDN, που ενδεχομένως υπάρχουν στο διάλυμα. Αντιθέτως, η EDN που είναι διαλυτή σε pH=5 θα μείνει στο υπερκείμενο. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο φυλάσσεται σε beaker.

Η διαδικασία της συμπύκνωσης πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 4 °C (στο cold room) με τη βοήθεια της ειδικής συσκευής φιλτραρίσματος Millipore-Pellicon XL Device (Millipore, Bedford, MA). Αρχικά ξεπλένεται η συσκευή με 500 ml dH<sub>2</sub>O, έπειτα γίνεται εξισορρόπηση με το buffer (~ 300 ml) και στη συνέχεια διέρχεται το δείγμα πρωτεϊνών. Σημειώνεται ότι το buffer που διαπερνάει την κασέτα είναι αυτό μέσα στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη, δηλαδή το refolding buffer. Η συμπύκνωση ολοκληρώνεται όταν ο όγκος του δείγματος από 348 ml γίνει πλέον 40ml, σε περίπου 1 h. Τέλος, συλλέγονται όσες πρωτεΐνες έχουν πιθανόν παραμείνει μέσα στην cassette.

## **2.13. Χρωματογραφικός καθαρισμός της EDN**

Ο καθαρισμός της EDN γίνεται με τη βοήθεια χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής. Με αυτό το είδος χρωματογραφίας, διαχωρίζονται φορτισμένα συστατικά, παραδείγματος χάρη πρωτεΐνες, πεπτίδια και αμινοξέα, καθώς περνούν από μία φορτισμένη στατική φάση. Η στατική φάση είναι συνήθως μία φορτισμένη ρητίνη η οποία φέρει λειτουργικές ομάδες οι οποίες αλληλεπιδρούν με αντίθετα φορτισμένες ομάδες συστατικών του υπό εξέταση μορίου.

Αν το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης σε pH=7 είναι θετικό, τότε θα δεσμευτεί σε στήλη από κόκκους που περιέχουν καρβοξυλικά ιόντα, ενώ μια αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη δε θα δεσμευτεί στη στήλη αυτή. Μια θετικά φορτισμένη πρωτεΐνη που είναι δεσμευμένη σε μια τέτοια στήλη μπορεί στη συνέχεια να εκλουστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου ή άλλου άλατος στο ρυθμιστικό διάλυμα έκλυσης. Τα ιόντα νατρίου συναγωνίζονται με τα θετικά φορτία της πρωτεΐνης για τη δέσμευση στη στήλη. Οι πρωτεΐνες που έχουν χαμηλή

συγκέντρωση θετικών φορτίων θα εκλουστούν πρώτες, ακολουθούμενες από αυτές με υψηλότερη συγκέντρωση θετικών φορτίων.

Η EDN είναι μια θετικά φορτισμένη πρωτεΐνη, και επομένως για τον καθαρισμό της χρησιμοποιήθηκε κατιοανταλλακτική στήλη, και συγκεκριμένα η Resource S με χωρητικότητα 1ml. Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography). Η μέγιστη πίεση που μπορεί να ασκηθεί στη στήλη αυτή είναι 1,5 MPa.

Η χρωματογραφία πραγματοποιείται στον ψυκτικό θάλαμο σε θερμοκρασία 4 °C, και ο απαραίτητος εξοπλισμός περιλαμβάνει αντλία για τη ρύθμιση της ταχύτητας ροής των διαλυμάτων στη στήλη και συσκευή συλλογής κλασμάτων (fraction collector).

Να αναφερθεί ότι, το δείγμα υποβλήθηκε 2 φορές σε χρωματογραφικό καθαρισμό.

Τα διαλύματα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα παρακάτω:

- Buffer A (0,15M Sodium acetate, pH=5), V=2 L
- Buffer B (0,15M Sodium acetate, pH=5, 2M NaCl) , V= 2 L

Τα διαλύματα είναι φιλτραρισμένα και απαερωμένα.

Αρχικά, η στήλη ξεπλένεται με διάλυμα που περιέχει 20 % αιθανόλη. Έπειτα, η πρωτεΐνη φορτώνεται στη superloop, και πραγματοποιείται εξισορρόπηση της στήλης με Buffer A το οποίο περνάει απ'όλο το σύστημα, ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεση της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης. Για μια εξισορρόπηση απαιτούνται πέντε όγκοι στήλης.

Έπειτα περνά δείγμα πρωτεϊνών με ροή 1ml/min. Το δείγμα πρέπει να βρίσκεται στο διάλυμα εξισορρόπησης. Αυτό επιτεύχθηκε με τη βοήθεια της διαπίδυσης που πραγματοποιήθηκε μετά τη συμύκνωση. Στο στάδιο αυτό, οι πρωτεΐνες που δε διαθέτουν το κατάλληλο φορτίο διέρχονται από τη στήλη χωρίς να προσδεθούν και συλλέγονται.

Ακολουθεί έκπλυση της στήλης με το διάλυμα εξισορρόπησης μέχρι η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm να μηδενιστεί. Αυτό μας εξασφαλίζει την απομάκρυνση όλων των πρωτεϊνών που δεν έχουν προσδεθεί στη στήλη.

Τέλος πραγματοποιείται έκλυση της EDN από τη στήλη με τη βοήθεια του Buffer B. Είναι γνωστό ότι η συλλογή της πρωτεΐνης μας γίνεται στο 20% του



Buffer B. Το άλας συνδέεται με το υλικό της στήλης και έτσι αποδεσμεύει τις πρωτεΐνες.

Με τη σταδιακή αύξηση της ιονικής ισχύος λοιπόν, οι πρωτεΐνες απομακρύνονται από τη στήλη ανάλογα με την ισχύ της πρόσδεσης τους σε αυτή.

Καθώς το έκλουσμα εξέρχεται από τη στήλη, διέρχεται από φωτόμετρο υπεριώδους που ελέγχει συνεχώς την περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνη με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm. Η οπτική απορρόφηση καταγράφεται και συλλέγονται κλάσματα με βάση το διάγραμμα του καταγραφέα. Τα κλάσματα στα οποία βρίσκεται η EDN έχουν στο διάγραμμα οπτικής απορρόφησης την μεγαλύτερη OD στα 280 nm. Τα κλάσματα αυτά φυλάσσονται στο ψυγείο προκειμένου να υποβληθούν σε έλεγχο καθαρότητας στο επόμενο στάδιο του πειράματος.

Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι μεταξύ των δύο χρωματογραφικών καθαρισμών, πραγματοποιήθηκε διαπίδυση. Η διαπίδυση (dialysis) είναι μια μέθοδος διαχωρισμού με βάση το μέγεθος κατά την οποία χρησιμοποιείται μια ημιπερατή μεμβράνη για να διαχωρίσει τον αναλύτη από τις παρεμποδίσεις. Οι μεμβράνες αυτές συνήθως κατασκευάζονται από κυτταρίνη (cellulose) με διάμετρο πόρων 1-5 nm. Το δείγμα τοποθετείται εντός δοχείου το οποίο είναι κατασκευασμένο από τη μεμβράνη αυτή και εμβαπτίζεται σε διάλυμα του οποίου η σύσταση διαφέρει από αυτή του δείγματος. Εάν η συγκέντρωση ενός συστατικού είναι διαφορετική εκατέρωθεν της μεμβράνης η δημιουργούμενη βαθμίδωση συγκέντρωσης παρέχει την κινητήρια δύναμη για τη διάχυσή της κατά μήκος της μεμβράνης. Έτσι, ενώ τα μικρά σωματίδια μπορούν να διέλθουν ελεύθερα μέσω της μεμβράνης, τα μεγαλύτερα κατακρατούνται. Η διαπίδυση ως μέθοδος διαχωρισμού χρησιμοποιείται συχνά στον καθαρισμό των πρωτεϊνών, ορμονών και ενζύμων.

Τοποθετούμε λοιπόν την πρωτεΐνη σε μεμβράνες διαπίδυσης, και έπειτα σε ένα ποτήρι ζέσεως που περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα της συμπύκνωσης και πραγματοποιείται η διαδικασία της διαπίδυσης. Το ρυθμιστικό διάλυμα της συμπύκνωσης (V=2000ml, pH=5) περιέχει 0,15M Sodium acetate. Λόγω όσμωσης, το NaCl μετακινείται προς τα έξω, ενώ το Sodium acetate προς τα μέσα. Γι' αυτό το λόγο απαιτείται και η αλλαγή buffer. Έτσι, η πρωτεΐνη βρίσκεται πλέον στο buffer A.

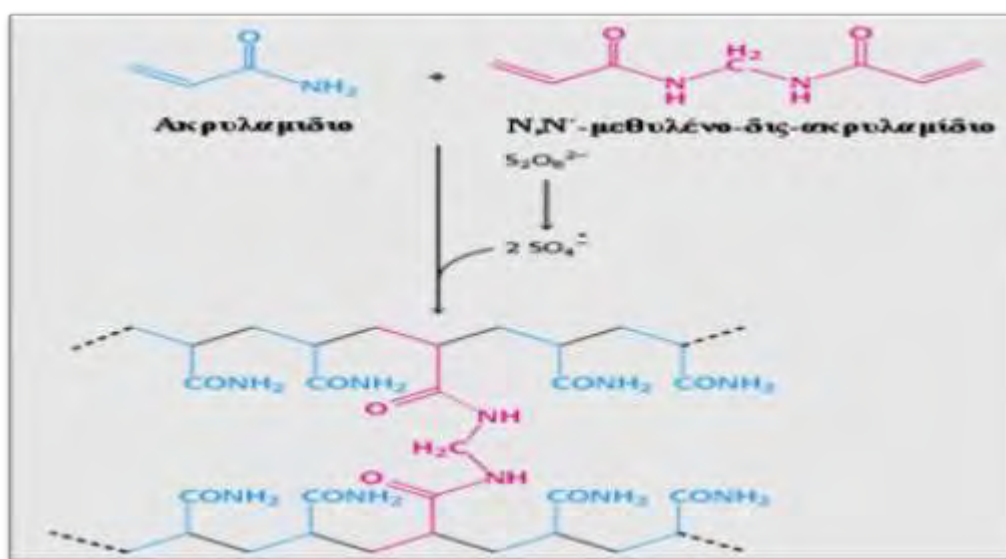
#### **2.14. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS PAGE)**

Η μετακίνηση ενός μορίου με καθαρό φορτίο σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, ονομάζεται ηλεκτροφόρηση. Η ηλεκτροφόρηση είναι μία μέθοδος διαχωρισμού, οπτικοποίησης και απομόνωσης με εφαρμογές σε ποικίλα επιστημονικά πεδία. Η τεχνική αυτή είναι απλή, γρήγορη και χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό του μεγέθους και της καθαρότητας ενός δείγματος, καθώς και για το διαχωρισμό μειγμάτων μορίων, τα οποία δεν είναι δυνατό να διαχωριστούν με άλλες τεχνικές. Δείγμα μπορεί να αποτελέσει οποιοδήποτε μόριο το οποίο φέρει φορτίο. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή μετανάστευσης φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται κατευθύνει τα φορτισμένα μόρια προς το ηλεκτρόδιο του αντίθετου φορτίου. Εξαιτίας των διαφορετικών φορτίων και μαζών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σχεδόν πάντα σε πηκτή, διότι η πηκτή λειτουργεί σα μοριακός ηθμός που ενισχύει το διαχωρισμό. Πραγματοποιείται λοιπόν σε πηκτώματα αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου. Η μέθοδος ηλεκτροφόρησης σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πρωτεϊνών, ανάλογα με το μοριακό βάρος και φορτίο τους. Η επιλογή εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος του δείγματος που πρόκειται να διαχωριστεί. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου με το μετά νατρίου άλας του θειϊκού δωδεκυλίου (SDS) χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο καθαρότητας διαφόρων παρασκευασμάτων, το χαρακτηρισμό των υπομονάδων μιας πρωτεΐνης και την εύρεση μοριακών βαρών πρωτεϊνικών αλυσίδων. Μάλιστα, χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μορίων όταν είναι αναγκαία μεγάλη διακριτική ικανότητα, ακόμη και μεταξύ μορίων που διαφέρουν σε μέγεθος μόνο κατά 0,1%. Αντίθετα, τα πηκτώματα αγαρόζης παρουσιάζουν μεγαλύτερο εύρος διαχωρισμού μεταξύ των μορίων <sup>34</sup>.

Στη συγκεκριμένη πειραματική εργασία, έγινε χρήση πηκτής πολυακρυλαμιδίου. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε μια λεπτή πλάκα πολυακρυλαμιδίου όπου η κατεύθυνση ροής είναι από πάνω προς τα κάτω. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου προτιμάται επειδή το υλικό της είναι χημικά ουδέτερο, διαφανές, σταθερό σε μεγάλο εύρος pH, θερμοκρασιών, ιονικής ισχύος και επειδή η παρασκευή της είναι απλή.

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου σχηματίζεται με αντίδραση συμπολυμερισμού ακρυλαμιδίου και  $N,N'$ -μεθυλένο-δισ-ακρυλαμιδίου (αντιδραστήριο διασταύρωσης). Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός μακρίων αλυσίδων ακρυλαμιδίου που συνδέονται μεταξύ τους με εγκάρσιες γέφυρες μορίων δισ-ακρυλαμιδίου, δημιουργώντας πηκτώματα με μέγεθος πόρων που εξαρτώνται από την αναλογία των δύο μορίων αλλά και από την ολική συγκέντρωση τους (**Εικόνα 19**). Έτσι αύξηση της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου, οδηγεί στη μείωση του μεγέθους των πόρων και το αντίστροφο. Η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου που θα χρησιμοποιηθεί τελικά, εξαρτάται από το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που θέλουμε να διαχωρίσουμε.



**Εικόνα 19:** Η αντίδραση σχηματισμού πηκτής πολυακρυλαμιδίου.

Ο πολυμερισμός γίνεται παρουσία μίας ουσίας που παρέχει ελεύθερες ρίζες, όπως είναι το υπερθειικό αμμώνιο (APS), και ενός καταλύτη, όπως είναι το  $N,N,N',N'$ -τετραμέθυλαιθυλενοδιαμίνη (TEMED), που καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες καταλύουν την αντίδραση πολυμερισμού. Επομένως, η όλη αντίδραση πολυμερισμού πρέπει να πραγματοποιηθεί απουσία  $O_2$ , αφού το τελευταίο μπορεί να δεσμεύει της ελεύθερες ρίζες και ως εκ τούτου να σταματήσει τη δημιουργία της πηκτής.

Συνεπώς η κινητικότητα των πολυπετιδικών αλυσίδων της πρωτεΐνης είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του μοριακού βάρους. Οι μικρές πρωτεΐνες

δηλαδή μετακινούνται εύκολα διαμέσου της πηκτής, ενώ οι μεγάλες μένουν στην κορυφή, κοντά στο σημείο τοποθέτησης του δείγματος.

Με την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Το πρωτεϊνικό παρασκεύασμα αντιδρά καταρχάς με περίσσεια мерκαπτοαιθανόλης και SDS. Κάτω απ' αυτές τις συνθήκες οι γέφυρες -S-S- που υπάρχουν στις πρωτεΐνες ανάγονται το SDS που προστίθεται στο μίγμα των πρωτεϊνών (sodium dodecyl sulfate) συνδέεται στις πρωτεΐνες μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με αποτέλεσμα να καταστρέφονται οι μη ομοιοπολικοί δεσμοί των πρωτεϊνών. Τα ανιόντα του SDS που δημιουργούνται δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες των πρωτεϊνών και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποδιάταξη τους, τον διαχωρισμό των υπομονάδων τους και τη δημιουργία συμπλόκων πρωτεΐνης- SDS. Στα σύμπλοκα αυτά, τα οποία όλα είναι αρνητικά φορτισμένα, ο λόγος της ποσότητας του SDS που συνδέεται ανά μονάδα μάζας πρωτεΐνης είναι σταθερός. Το αρνητικό φορτίο που αποκτάται είναι πολύ μεγαλύτερο από ότι το αρχικό φορτίο της πρωτεΐνης, επομένως το αρχικό φορτίο καθίσταται αμελητέο και έτσι η κινητικότητα των πρωτεϊνών στη πηκτή εξαρτάται μόνο από το μοριακό τους βάρος. Πρωτεΐνες μικρής μοριακής μάζας κινούνται ταχύτερα στους πόρους της πηκτής από πρωτεΐνες μεγαλύτερης μοριακής μάζας. Οι μικρές πρωτεΐνες δηλαδή μετακινούνται εύκολα διαμέσου της πηκτής, ενώ οι μεγάλες μένουν στην κορυφή, κοντά στο σημείο τοποθέτησης του δείγματος.

Συνήθως γίνεται και περαιτέρω αποδιάταξη των πρωτεϊνών, πριν την ηλεκτροφόρηση, είτε με χρήση αντιδραστηρίων που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, όπως είναι η 2-μερκαπτοαιθανόλη ή με θέρμανση στους 100 °C. Τα βήματα αυτά γίνονται έτσι ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη και μετουσίωση των πρωτεϊνών.

Η πιο δημοφιλής τεχνική SDS-PAGE είναι αυτή που αναπτύχθηκε από τον Laemmli το 1979. Πρόκειται για μια μη συνεχή ηλεκτροφόρηση πηκτής: η πηκτή αποτελείται από δύο τμήματα, την πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel) και την πηκτή διαχωρισμού (running gel) οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος των πόρων, το pH και την ιονική ισχύ. Ο ρόλος της πηκτής επιστοίβαξης, η οποία έχει μεγαλύτερο μέγεθος πόρων και μικρότερο pH από την πηκτή διαχωρισμού, είναι να συσσωρεύσει τις πρωτεΐνες σε μια στενή περιοχή, ώστε να εισέλθουν στη πηκτή διαχωρισμού ως μια λεπτή ταινία και να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των πρωτεϊνών.

Μετά την ηλεκτροφόρηση οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες είναι δυνατόν να ανιχνευθούν με χρώση Coomassie Blue. Η χρώση αυτή γίνεται σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον, που ευνοεί τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στη χρωστική και τις αμινομάδες των πρωτεϊνών, ενώ γίνονται και αλληλεπιδράσεις χρωστικής-πρωτεϊνών μέσω δυνάμεων van der Waals. Με τη μέθοδο αυτή ανιχνεύονται μέχρι 0,1 µg πρωτεΐνης ανά ταινία. Εναλλακτικά, η χρώση μπορεί να γίνει με χρώση αργύρου (silver staining), η οποία χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά μεγάλη ευαισθησία (ικανότητα ανίχνευσης ng πρωτεΐνης- μέχρι 1 ng). Η χρώση αυτή χρησιμοποιείται μόνο σε περιπτώσεις που είναι επιθυμητή η ανίχνευση πολύ μικρών ποσοτήτων πρωτεϊνών, καθώς η τεχνική αυτή είναι αρκετά χρονοβόρα και πολύπλοκη, συγκριτικά με την Coomassie Blue.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η χρώση με Coomassie Blue.

#### **2.14.1. Πειραματική διαδικασία**

Από την ποσότητα της EDN που αποκτήσαμε μετά τη δεύτερη στήλη, τα 15 µl χρησιμοποιούνται για την ηλεκτροφόρηση. Με βάση το μικρό μοριακό βάρος της πρωτεΐνης (18,4kDa), παρασκευάζεται πυκνό gel 15% SDS και ηλεκτροφορείται στα 120V.

Αφού συναρμολογηθεί κατάλληλα η συσκευή ηλεκτροφόρησης, αρχικά φορτώνεται το Running Gel. Το TEMED πρώτα και το APS έπειτα, προστίθενται πάντα τελευταία, πριν τη φόρτωση του gel στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Πάνω από αυτό, τοποθετείται H<sub>2</sub>O ή ισοπροπανόλη προκειμένου να αποφευχθεί η αντίδραση μεταξύ του ατμοσφαιρικού οξυγόνου με το gel, και ο επακόλουθος πολυμερισμός. Μόλις πήξει το running gel, αφαιρείται το H<sub>2</sub>O ή η ισοπροπανόλη που έχει προστεθεί, και τοποθετείται το stacking gel, το οποίο έχει παραχθεί κατά τον ίδιο τρόπο. Πάνω σε αυτό εφαρμόζονται και τα ειδικά χτενάκια, τα οποία θα δημιουργήσουν τις θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων.

Πριν φορτωθούν τα δείγματα υφίστανται την παρακάτω επεξεργασία:

1. Με βάση τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης με Bradford πριν τη Resource S, τοποθετήθηκαν σε eppendorf 20µl από κάθε υπό εξέταση δείγμα (εκτός από την EDN final που φορτώθηκαν 15 µl), μαζί με 5µl loading buffer. Ως υπό εξέταση δείγματα θεωρούνται το δείγμα με τις ολικές πρωτεΐνες (EDN<sub>Total</sub>) πριν τον καθαρισμό, το δείγμα μετά την πρώτη στήλη

(EDN<sub>1st MONO S</sub>) και το δείγμα με την τελική πρωτεΐνη (EDN<sub>Final</sub>), δηλαδή όλα εκείνα τα κλάσματα που προέκυψαν από τον χρωματογραφικό καθαρισμό με την μεγαλύτερη οπτική απορρόφηση στα 280nm.

2. Τα eppendorf που περιέχουν τα υπό εξέταση δείγματα θερμαίνονται στους 95°C για 5min μαζί με τη χρωστική. Μετά το πέρας των 5min, φορτώνονται στο gel.

Μαζί με τα δείγματα, στο gel φορτώνεται και ο μάρτυρας ladder (5μl).

#### **2.14.2 Χρώση με Coomassie Brilliant Blue Staining**

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα διαλύματα:

**Διάλυμα χρώσης (Staining solution) 1L :**

- 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250 2,5g
- 50% μεθανόλη 500 ml
- 10% οξικό οξύ 100 ml
- υπερκάθαρο νερό 400 ml

Το διάλυμα φιλτράρεται μέσω φίλτρου Whatman No.1 για να απομακρυνθούν οι μολύνσεις.

**Διάλυμα αποχρωματισμού (Destaining Solution) 1 L :**

- υπερκάθαρο νερό 785 ml
- αιθανόλη 165 ml
- οξικό οξύ 50 ml

Η διαδικασία έχει ως εξής:

Με την συμπλήρωση της SDS – PAGE, το πήκτωμα μεταφέρθηκε σε

κατάλληλο δοχείο το οποίο περιείχε διάλυμα χρώσης (περίπου 100 mL). Το

δοχείο τοποθετήθηκε σε ανακινούμενη πλάκα και αφέθηκε να αναδευτεί ελαφρά για τουλάχιστον 1 ώρα. Στην συνέχεια αφού απομακρύνθηκε το διάλυμα χρώσης και το gel ξεπλύθηκε με D-H<sub>2</sub>O, προστέθηκε το διάλυμα αποχρωματισμού και η ανάδευση συνεχίστηκε για αρκετές ώρες. Με την διαδικασία αυτή η πηκτή (gel) αποχρωματίστηκε και παρέμειναν χρωματισμένες (μπλέ – μώβ) μόνο οι ζώνες των πρωτεϊνών. Τα πρωτεϊνικά πρότυπα παρατηρήθηκαν σε φωτεινή τράπεζα. Με την

διαδικασία αυτή ανιχνεύτηκαν ζώνες που περιείχαν το λιγότερο 0,1–1 μg πρωτεΐνης.

### **2.15. Υπολογισμός συγκέντρωσης της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης**

Η συγκέντρωση της EDN προσδιορίστηκε με φωτομέτρηση στα 280nm με τη βοήθεια της σχέσης των Beer-Lambert:

$$A = \epsilon \times b \times c,$$

όπου A: η οπτική απορρόφηση της πρωτεΐνης (μετρήθηκε ότι  $A=1,64$ )

$\epsilon$ : ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης της πρωτεΐνης (για την EDN είναι γνωστό ότι  $\epsilon=1,64$ ),

b: το πάχος της κυψελίδας (1 cm)

c: συγκέντρωση εξεταζόμενης πρωτεΐνης.

### **2.16. Εισαγωγή Κρυσταλλώσεων**

#### **2.16.1 Διάχυση ατμών**

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος κρυστάλλωσης πρωτεϊνών είναι αυτή της διάχυσης ατμών, και εφαρμόζεται τις περισσότερες φορές με τις τεχνικές της α) κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop), β) της καθήμενης σταγόνας (sitting drop) και γ) της σταγόνας sandwich. Για τη δημιουργία κρυστάλλων το υδατικό πρωτεϊνικό διάλυμα αναμιγνύεται με διάλυμα ενός καταβυθιστικού (precipitant), το οποίο είναι συνήθως κάποιο άλας, PEG (πολυαιθυλενογλυκόλη) ή μικρά οργανικά μόρια και το σύστημα αφήνεται να ισορροπήσει. Επειδή η συγκέντρωση των ιόντων άλατος είναι μεγαλύτερη στο καταβυθιστικό διάλυμα που βρίσκεται στο εσωτερικό του θαλάμου κρυστάλλωσης από το μίγμα του πρωτεϊνικού διαλύματος με το καταβυθιστικό διάλυμα που βρίσκεται στην επιφάνεια, μόρια διαλύτη θα κινηθούν από τη σταγόνα της πρωτεΐνης προς το δοχείο με διάχυση ατμών στην αέρια φάση.

Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας η διαλυτότητα της πρωτεΐνης στη σταγόνα ελαττώνεται. Το διάλυμα της πρωτεΐνης στη σταγόνα τελικά γίνεται υπερκορεσμένο, μια κατάσταση που είναι θερμοδυναμικά ασταθής.

Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μέρος της πρωτεΐνης στη σταγόνα είτε να σχηματίζει κρυσταλλικούς πυρήνες που τελικά θα μεγαλώσουν για να γίνουν μεγάλοι κρύσταλλοι πρωτεΐνης.

#### **2.16.2. Τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop)**

Η μία μέθοδος κρυστάλλωσης που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο ήταν αυτή της κρεμάμενης σταγόνας (**Εικόνα 20**). Η τεχνική περιγράφεται ως εξής:

Μια σταγόνα μίγματος πρωτεϊνικού διαλύματος και διαλύματος καταβυθιστικού τοποθετείται στο μέσο μιας υδρόφοβης καλυπτρίδας (σταγόνα κρυστάλλωσης). Η σταγόνα αποτελείται από διάλυμα της πρωτεΐνης και του καταβυθιστικού σε αναλογία 1:1 (συνήθως αναμιγνύονται 2-5  $\mu\text{L}$  από το κάθε διάλυμα). Η καλυπτρίδα τοποθετείται πάνω από σχετικά μεγάλο όγκο (700- 1000  $\mu\text{L}$ ) διαλύματος καταβυθιστικού (δεξαμενή) και το σύστημα κλείνεται αεροστεγώς δημιουργώντας έτσι ένα απομονωμένο σύστημα όπου δεν λαμβάνει χώρα ανταλλαγή ύλης και ενέργειας (Εικόνα 19). Αποτέλεσμα των πιο πάνω είναι, η συγκέντρωση του καταβυθιστικού να είναι μεγαλύτερη στη δεξαμενή από ότι στη σταγόνα και αυτό για ένα κλειστό σύστημα σημαίνει ότι για την αποκατάσταση της ισορροπίας απομακρύνεται νερό από το αραιό διάλυμα, δηλ. τη σταγόνα, και μετατοπίζεται προς τη δεξαμενή ωστόσο η τάση ατμών της σταγόνας και της δεξαμενής να εξισωθούν. Η απομάκρυνση νερού όμως έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των συστατικών της σταγόνας. Όταν η συγκέντρωση του καταβυθιστικού και της πρωτεΐνης φτάσει στην βέλτιστη τιμή τότε η πρωτεΐνη κρυσταλλώνεται.

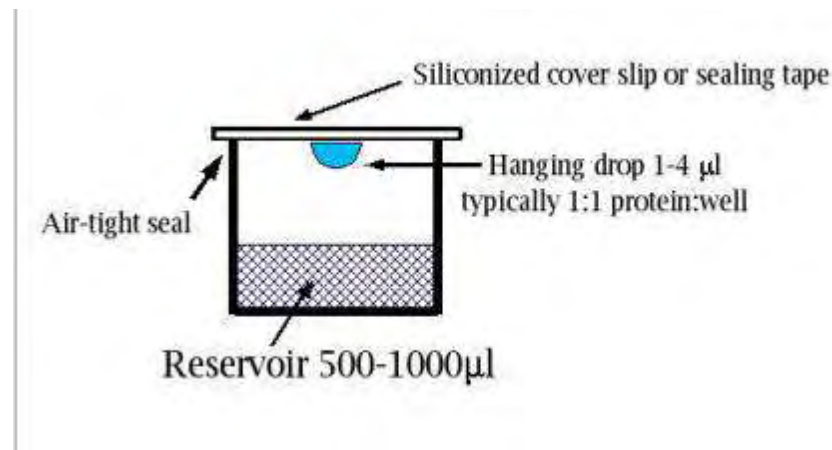
Για να κρυσταλλωθεί η EDN, αρχικά συμπυκνώθηκε στα 8mg/mL χρησιμοποιώντας συσκευές φυγοκεντρικού φίλτρου με όρια ονομαστικής τιμής μοριακού βάρους 3000 (3000 cut off). Αυτό συμβαίνει διότι, προκειμένου να δημιουργηθούν κρύσταλλοι, η συγκέντρωση της EDN στη σταγόνα πρέπει να είναι τουλάχιστον 3,5mg/mL.

Επιπλέον, παρασκευάστηκε ένα διάλυμα κρυστάλλωσης (reservoir solution) το οποίο αποτελούνταν από:

- ✓ 0,1M Sodium Cacodylate/HCl pH 6,5
- ✓ 1,5M Sodium Acetate

Στο ρεζερβουάρ κάθε πλακιδίου κρυστάλλωσης τοποθετούνται 700  $\mu\text{L}$  από το παραπάνω διάλυμα, και στη συνέχεια στην καλυπτρίδα αναμιγνύονται 1  $\mu\text{L}$  από το διάλυμα του ρεζερβουάρ με 1  $\mu\text{L}$  από το διάλυμα της EDN. Οι καλυπτρίδες εφαρμόζονται και σφραγίζονται πάνω από τα ρεζερβουάρ του πλακιδίου. Μετά το πέρας 7-10ημερών γίνεται ορατό αν έχουν σχηματιστεί ή όχι κρύσταλλοι.





**Εικόνα 20: Η τεχνική hanging drop.**

## **2.17 Κινητική μελέτη της EDN**

### **2.17.1 Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης**

Η ειδική δραστηριότητα ή καθαρότητα (specific activity) ορίζεται ως τα mg του ένζυμου που προκαλούν μετατροπή 1  $\mu\text{mol}$  υποστρώματος ή παρασκευή 1  $\mu\text{mol}$  προϊόντος ανά 1 λεπτό κάτω από καθορισμένες συνθήκες. Οι μονάδες της ειδικής δραστηριότητας είναι  $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$ . Η ειδική δραστηριότητα εκφράζει όχι μόνο τη δραστηριότητα αλλά και την ποσότητα του εξεταζόμενου ενζύμου<sup>51</sup>.

### **2.17.2. Περιγραφή της μεθόδου**

Η δραστηριότητα της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης προσδιορίστηκε λοιπόν, ακολουθώντας μια μέθοδο κατακρήμνισης με υποστρώμα tRNA ζύμης σύμφωνα με τα πειράματα των Afinsen et al. Η αποικοδόμηση του RNA από την ηωσινόφιλη νευροτοξίνη πραγματοποιείται όπως ακριβώς και στη ριβονουκλεάση A, σε δύο στάδια, το στάδιο της τρανσφωσφο-ρυλίωσης και το στάδιο της υδρόλυσης του κυκλικού ενδιαμέσου.

Η ταχύτητα της τρανσφωσφορυλίωσης είναι μεγαλύτερη από αυτήν της υδρόλυσης και ποικίλει ανάλογα με το υπόστρωμα. Το υπόστρωμα και το τελικό προϊόν έχουν συνήθως τον ίδιο συντελεστή μοριακής απορρόφησης ενώ το κυκλικό ενδιαμέσο εμφανίζει μικρότερη απορρόφηση στο ίδιο μήκος κύματος. Η ταχύτητα

της υδρόλυσης του φωσφοδιεστερικού δεσμού μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά από τη μείωση της συγκέντρωσης του υποστρώματος σε μήκος κύματος που εμφανίζει τη μέγιστη διαφορά στην απορρόφηση μεταξύ του υποστρώματος και του κυκλικού ενδιαμέσου.

### **2.17.3. Προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_m$ )**

Στην παρούσα εργασία, η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε βασίστηκε στη μέθοδο του Anfinsen (1954), όπως αυτή τροποποιήθηκε από την Slifman (1986).

Η σταθερά Michaelis-Menten ( $K_m$ ), αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης ( $V_{max}$ ).

Για τον προσδιορισμό απαιτείται η παρασκευή ενός διαλύματος χρήσης (reaction buffer), στο οποίο διαλύεται το υπόστρωμα (tRNA) και περιέχει τα έξως αντιδραστήρια: 0,05 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  με pH 7,4.

Αρχικά, παρασκευάζονται μεγάλης συγκέντρωσης διαλύματα (stock solutions) όλων των αντιδραστηρίων, κατάλληλοι όγκοι των οποίων αναμιγνύονται για την παρασκευή του διαλύματος χρήσης λίγο πριν πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός. Ο προσδιορισμός αυτός, απαιτεί την κινητική μελέτη του ενζύμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος (tRNA). Οι συγκεντρώσεις tRNA που χρησιμοποιήθηκαν κυρίως για τον προσδιορισμό της σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_m$ ) είναι: 2  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  και 6  $\mu\text{M}$ .

Η πειραματική διαδικασία είναι η ακόλουθη: Μετά τη διάλυση του tRNA στο διάλυμα χρήσης, υπολογίζονται οι ακριβείς ποσότητες αντιδραστηρίων που απαιτούνται για την αντίδραση. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 300  $\mu\text{l}$ , ενώ η έναρξή της πραγματοποιείται μόλις προστεθεί το ένζυμο. Η EDN έχει αραιωθεί με MilliQ  $\text{H}_2\text{O}$ , ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 60 nM. Η αντίδραση σταματά μετά από 5 min αναμιγνύοντας 300  $\mu\text{l}$  από το διάλυμα αντίδρασης με 300  $\mu\text{l}$  διαλύματος (stop solution) που αποτελείται από 40mM Lanthanum Nitrate και 6% Perchloric acid (συμβάλλουν στην κατακρήμνιση του μη υδρολυμένου tRNA). Το πείραμα πραγματοποιείται στους 30°C σε pH 7,4. Γι αυτό το λόγο, πριν την έναρξη της αντίδρασης το διάλυμα χρήσης μαζί με το υπόστρωμα επωάζονται για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 30 °C. Κατόπιν, όπως προαναφέραμε, προστίθεται το ένζυμο, οπότε και ξεκινά η αντίδραση. Μετά από 5 min αφού έχει προστεθεί η EDN, σταματάμε την αντίδραση με stop solution και τοποθετούμε τους σωλήνες στον πάγο.

Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρώνται σε θερμοκρασία 4 °C, στις 13.200 στροφές (rpm) για 17 min, όπου καθιζάνει το αδιάλυτο υπόστρωμα που δεν χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση. Έπειτα, παραλαμβάνονται 560μl από το υπερκείμενο και φωτομετρούνται. Να σημειωθεί πως για κάθε πείραμα, χρησιμοποιείται μια κυψελίδα υπεριώδους και πως πάντα υπάρχει ένα διάλυμα αναφοράς (τυφλό) το οποίο περιέχει ότι και το εκάστοτε δείγμα εκτός από το ένζυμο και το υπόστρωμα, με το οποίο μηδενίζουμε το φωτόμετρο πριν φωτομετρήσουμε το δείγμα. Επιπλέον, εκτός από το διάλυμα αναφοράς (tRNA=0), παρασκευάζεται και ένα διάλυμα για κάθε μία συγκέντρωση υποστρώματος το οποίο περιέχει ότι και το εκάστοτε δείγμα εκτός από το ένζυμο, των οποίων οι απορροφήσεις αφαιρούνται από αυτές των δειγμάτων, έτσι ώστε να αφαιρείται η τιμή του ενδογενώς υδρολυμένου tRNA. Τα διαλύματα αυτά αποτελούν τα τυφλά (blank).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του υδρολυμένου tRNA που παράγεται, πραγματοποιείται με καταγραφή της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 260nm<sup>54</sup>. Τέλος, τα αποτελέσματα που λαμβάνονται επεξεργάζονται με το πρόγραμμα Grafit. Παρακάτω δίνονται οι πίνακες με τις σχετικές ποσότητες των τυφλών (**Πίνακας 3**) και των διαλυμάτων που κατασκευάστηκαν για τον υπολογισμό της  $K_m$  (**Πίνακας 4**).

**Πίνακας 3:** Ποσότητες των τυφλών διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν για τον υπολογισμό της  $K_m$  της EDN.

| 10nM EDN             | t=5min |     | $K_m$ |     | T=30oC |     |
|----------------------|--------|-----|-------|-----|--------|-----|
|                      |        |     |       |     |        |     |
| tRNA conc            | 0μM    | 2μM | 3μM   | 4μM | 5μM    | 6μM |
| δ/μα αντιδρ.(pH 7.4) | 150    | 150 | 150   | 150 | 150    | 150 |
| tRNA (60μM)          | 0      | 10  | 15    | 20  | 25     | 30  |
| dH2O                 | 150    | 140 | 135   | 130 | 125    | 120 |
| STOP buffer          | 300    | 300 | 300   | 300 | 300    | 300 |
| ABS260               |        |     |       |     |        |     |
|                      |        |     |       |     |        |     |

**Πίνακας 4:** Ποσότητες των διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν για τον υπολογισμό της  $K_m$  της EDN.

| 10nM EDN             | t=5min | $K_m$ | T=30oC |     |     |
|----------------------|--------|-------|--------|-----|-----|
| <i>tRNA conc</i>     | 2μM    | 3μM   | 4μM    | 5μM | 6μM |
| δ/μα αντιδρ.(pH 7.4) | 150    | 150   | 150    | 150 | 150 |
| tRNA (60μM)          | 10     | 15    | 20     | 25  | 30  |
| EDN (60μM)           | 50     | 50    | 50     | 50  | 50  |
| dH2O                 | 90     | 85    | 80     | 75  | 70  |
| STOP buffer          | 300    | 300   | 300    | 300 | 300 |
| ABS260               |        |       |        |     |     |

#### 2.17.4. Κινητική μελέτη της EDN παρουσία αναστολέα

Η παρουσία αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας υδρόλυσης του tRNA και απελευθέρωσης μορίων CMP. Η μείωση αυτή μπορεί να εκφραστεί ως αναστολή σύμφωνα με γνωστά μοντέλα ενζυμικής αναστολής.

Η σταθερά  $IC_{50}$  ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50% μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Ο προσδιορισμός της προϋποθέτει την μελέτη της κινητικής του ενζύμου με κάποιο αναστολέα στην περιοχή της  $IC_{50}$  και για συγκεκριμένη συγκέντρωση tRNA.

Η συγκέντρωση tRNA που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της  $IC_{50}$  είναι 2μM. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται είναι ακριβώς η ίδια με αυτή για τον προσδιορισμό της  $K_m$  με τη μόνη διαφορά ότι σε κάθε διάλυμα προστίθεται και διάλυμα αναστολέα διαφορετικής συγκέντρωσης.

Αρχικά, οι απορροφήσεις των δειγμάτων διορθώνονται ως προς την απορρόφηση λόγω της φυσικής υδρόλυσης του tRNA. Έπειτα, ακολουθεί ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου παρουσία ή απουσία αναστολέα. Η ειδική δραστηριότητα (specific activity,  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) αποτελεί έκφραση της ποσότητας, αλλά και της δραστηριότητας ενός ένζυμου. Ορίζεται ως τα mg του ένζυμου που προκαλούν μετατροπή 1  $\mu\text{mol}$  υποστρώματος (ή παρασκευή 1  $\mu\text{mol}$  προϊόντος) ανά 1 λεπτό σε καθορισμένες συνθήκες.

Συνήθως, οι ποσότητες των προς εξέταση ουσιών δεν είναι μεγάλες και αυτό περιορίζει την δυνατότητα για μεγάλο αριθμό πειραμάτων, τα οποία θα μπορούσαν να καλύψουν την πιθανότητα για την εξαγωγή τόσο των κινητικών παραμέτρων για την ανίχνευση της επίδρασης του αναστολέα στο ένζυμο, όσο και των κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Σκοπός του ερευνητή είναι να μπορέσει να προσεγγίσει όσο το δυνατό καλύτερα τη συγκέντρωση του αναστολέα στην οποία παρατηρείται μείωση της ενζυμικής δραστηρότητας κατά 50%.

#### **2.17.5. Επεξεργασία κινητικών δεδομένων για τον υπολογισμό $K_m$ και $IC_{50}$**

##### Υπολογισμός $K_m$

Αρχικά, έγιναν κινητικά πειράματα, εις τριπλούν, για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος που επιλέχθηκαν (2, 3, 4, 5, 6  $\mu\text{M}$ ). Για κάθε αντίδραση συλλέχθηκε ένα σύνολο σημείων τα οποία σχηματίζουν την καμπύλη της αντίδρασης κατάλυσης. Όπως ήδη αναφέρθηκε, για μικρό χρονικό διάστημα η καμπύλη μπορεί να θεωρηθεί ευθεία. Έτσι με τη χρήση του προγράμματος Grafit (GraFit version 4.06. Erithacus Software Ltd Staines, UK) προσδιορίστηκε η κλίση της καλύτερα προσαρμοσμένης ευθείας που διατρέχει τα σημεία <sup>36</sup>. Η κλίση αντιπροσωπεύει το ρυθμό της απορρόφησης ανά λεπτό, ο οποίος μπορεί να μετατραπεί σε ταχύτητα αντίδρασης ( $v$ , καταλυτικές μονάδες, 1/s) σύμφωνα με τον τύπο:

$$v(s^{-1}) = \frac{\text{Slope}(min^{-1}cm^{-1})}{\varepsilon(M^{-1}cm^{-1})60(sec)[EDN](M)}$$

όπου, Slope: η κλίση της ευθείας,

$\varepsilon$ : συντελεστής απορρόφησης,

$\lambda$ : μήκος κύματος (278 nm) ,

[EDN] : η συγκέντρωση του ενζύμου.

Τα δεδομένα αυτά στη συνέχεια αναλύθηκαν για τον προσδιορισμό της  $K_m$  και της  $V_{max}$ . Στη στατιστική επεξεργασία εφαρμόζεται η μέθοδος της γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression), η οποία παρέχει και τις τυπικές αποκλίσεις ( $\sigma^2$ ) των τιμών (explicit weighting). Ο υπολογισμός των τιμών  $K_m$  και  $V_{max}$  γίνεται από την εξίσωση των Michaelis-Menten:

$$V = \frac{V_{max} * S}{K_m + S}$$

Το πρόγραμμα GRAFIT χρησιμοποιεί τα δεδομένα στην εξίσωση Michaelis-Menten και υπολογίζει την  $K_m$  και τη  $V_{max}$  με το τυπικό σφάλμα. Τέλος, γίνεται από το ίδιο πρόγραμμα το γράφημα Lineweaver-Burk. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται και ο υπολογισμός της  $K_m$  και  $V_{max}$  της EDN.

Οι τιμές των  $K_m$  των ενζύμων ποικίλουν. Για τα περισσότερα ένζυμα, η  $K_m$  έχει τιμές μεταξύ  $10^{-1}$  και  $10^{-7}$  M. Η τιμή  $K_m$  για ένα ένζυμο εξαρτάται από το συγκεκριμένο υπόστρωμα, καθώς επίσης και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες όπως το pH, θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς. Η  $K_m$  έχει την εξής έννοια: είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος όπου τα μισά από τα ενεργά κέντρα έχουν καταληφθεί από υπόστρωμα.

#### Υπολογισμός $IC_{50}$

Η στατιστική επεξεργασία των κινητικών δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα Grafit, εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση (non-linear regression) και θεωρώντας ότι τα σφάλματα είναι ίδια για κάθε πειραματική τιμή (ομοσκεδαστικότητα 'simple weighting'). Εφ' όσον η αντίδραση πραγματοποιείται σε έναν μόνο χρόνο, 1min, η εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της ειδικής δραστηριότητας είναι η εξής:

$$\underline{Sp. activity = (OD-Blank) / 516,4 * 0,00000001 * 300} \quad \mu\text{moles CMP} / \text{min} * \text{M ενζύμου}$$

όπου 516,4: είναι ο συντελεστής απορρόφησης του tRNA

0,00000001: τα M του ενζύμου στην αντίδραση

300: 5min \* 60 sec

Στον προσδιορισμό της σταθεράς  $IC_{50}$ , οι ειδικές δραστηριότητες παρουσία αναστολέα μετατρέπονται σε επί τοις εκατό αναστολή χρησιμοποιώντας την ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα. Από τα πειραματικά δεδομένα εξάγονται οι ειδικές δραστηριότητες του ενζύμου για την εκάστοτε περίπτωση και

υπολογίζεται η επί τοις εκατό αναστολή για κάθε συγκέντρωση αναστολέα βάσει του τύπου:

$$\% \text{αναστολή} = \frac{S.a._{\text{control}} - S.a._i}{S.a._{\text{control}}} \times 100\%$$

όπου:  $S.a._{\text{control}}$  : η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα

$S.a._i$  : η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου παρουσία  $i$  συγκεντρώσεως αναστολέα

Η τιμή  $IC_{50}$  υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

$$y = \frac{100\%}{1 + \left( \frac{x}{IC_{50}} \right)^s}$$

όπου:  $s$ : η κλίση της ευθείας

Στην εξίσωση θεωρείται ότι η παράμετρος  $y$  μειώνεται όσο η  $x$  αυξάνει.

Το πείραμα για την εξαγωγή της  $IC_{50}$  θεωρείται επιτυχές, εφόσον υπάρχουν εκατέρωθεν της τιμής της τουλάχιστον δύο συγκεντρώσεις αναστολέα, που προκαλούν αναστολή από 10%-50% και 50%-90%. Η τιμή της  $IC_{50}$  προκύπτει από το διάγραμμα  $\% \text{αναστολή} = f([I])$ . Από την τιμή της  $IC_{50}$  προκύπτει κατά προσέγγιση η τιμή της σταθεράς αναστολής  $K_i$  που αποτελεί όπως και η  $K_m$  έκφραση της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα της αντίδρασης παρουσία ενός αναστολέα βάσει του τύπου:

$$IC_{50} = \left( 1 + \frac{[S]}{K_m} \right) K_i$$

Όπου  $[S]$  η συγκέντρωση του υποστρώματος.

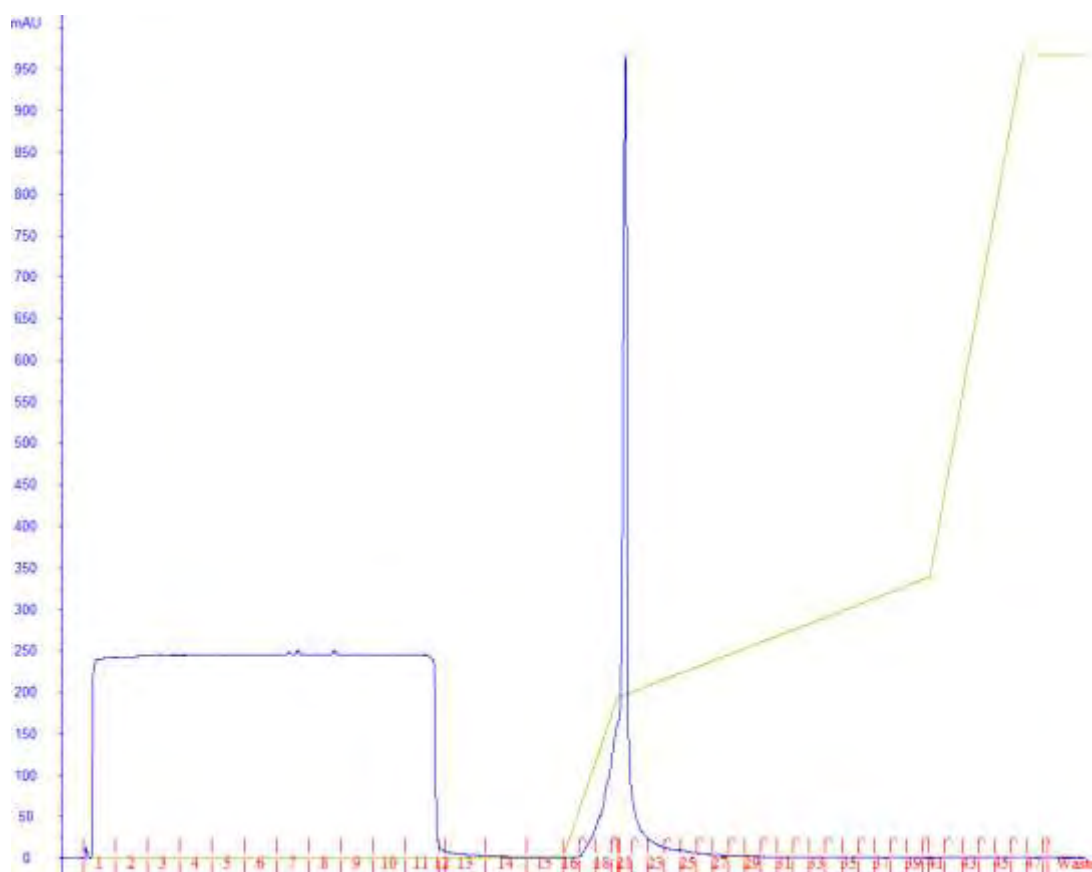
Εν συνεχεία, γίνεται μετατροπή της τιμής  $IC_{50}$  σε  $K_i$  σύμφωνα με τον τύπο:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{\left( S / K_m + 1 \right)}$$

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Χρωματογραφικός προσδιορισμός της EDN με στήλη ιοντοανταλλαγής

Το διάλυμα της πρωτεΐνης που προέκυψε μετά τη διαδικασία της συμπύκνωσης, φορτώθηκε σε στήλη Resource S και εξισορροπήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα 0,15M Sodium acetate, pH= 5 με ροή 1ml/min . Για την εξισορρόπηση χρησιμοποιήθηκαν 5 όγκοι στήλης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έκπλυσή της με το ίδιο διάλυμα μέχρι τη στιγμή μη ανιχνεύσιμης απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm, δηλαδή τη στιγμή εκείνη που δεν ανιχνεύονταν πρωτεΐνη. Έπειτα, ακολούθησε έκλουση της EDN από τη στήλη μέσω διαβίβασης ρυθμιστικού διαλύματος Sodium acetate 0,15M, pH= 5 με βαθμίδωση της συγκέντρωσης NaCl 0-2000mM (**Εικόνα 21**).

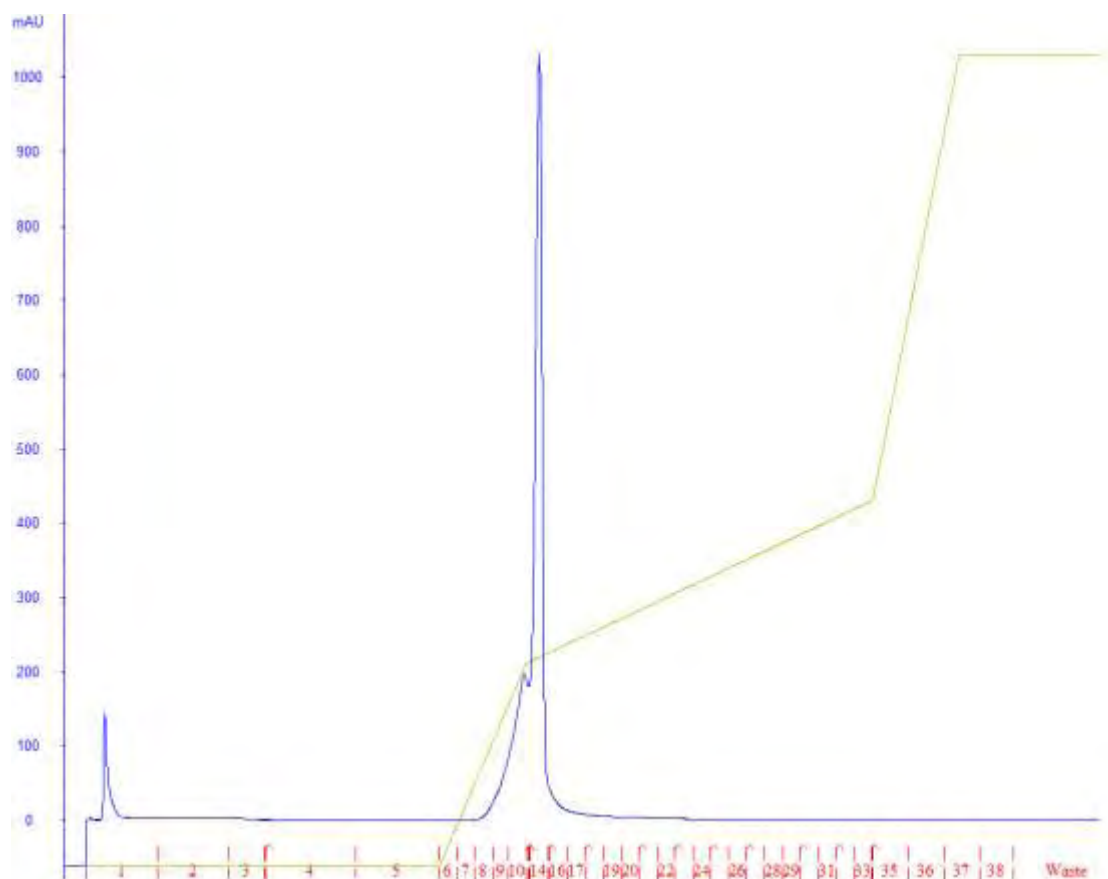


**Εικόνα 21:** Ο χρωματογραφικός καθαρισμός της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης με χρήση χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής Resource S. Η έκλουση έγινε με βαθμίδωση συγκέντρωσης NaCl 0-2000mM.

Συλλέχθηκαν 6 κλάσματα (17-22) των 2 ml, τα οποία εμφάνισαν την κορυφή στο 20 % του buffer B.



Τα κλάσματα στα οποία παρατηρούνταν η μεγαλύτερη απορρόφηση στα 280 nm, συλλέχθηκαν, ενώθηκαν και καθαρίστηκαν περαιτέρω μέσω χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής, ακολουθώντας την ίδια ακριβώς διαδικασία (**Εικόνα 22**).



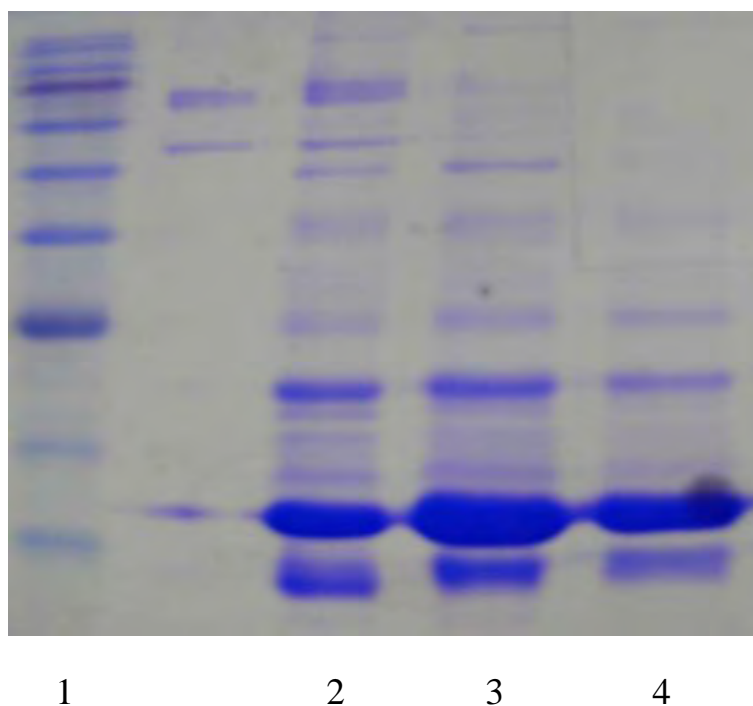
**Εικόνα 22:** Ο χρωματογραφικός καθαρισμός της ηωσινόφιλης νευροτοξίνης με χρήση χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής Resource S για 2<sup>η</sup> φορά. Η έκλουση έγινε με βαθμίδωση συγκέντρωσης NaCl 0-2000mM.

Το peak εμφανίστηκε στα κλάσματα (9-15) στο 25,70 % του buffer B. Παρ'όλα αυτά, στα κλάσματα (11-14) συλλέχτηκε λιγότερο από 1 ml με αποτέλεσμα η συνολική ποσότητα πρωτεϊνών που πήραμε να είναι 3 ml.

### 3.2. Ηλεκτροφόρηση κλασμάτων

Πραγματοποιήθηκε αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS στα 120V και στη συνέχεια, ακολούθησε χρώση της πηκτής αυτής με Coomassie Brilliant Blue Staining (**Εικόνα 23**). Στην εικόνα αυτή διακρίνονται τα παρακάτω:

- ✓ Η πρώτη διαδρομή από τα αριστερά είναι ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε. Η τελευταία μπάντα αυτού του marker είναι στα 15 kDa (1)
- ✓ Η δεύτερη διαδρομή από τα δεξιά είναι το ολικό δείγμα πρωτεϊνών (2).
- ✓ Η επόμενη διαδρομή είναι η EDN που πήραμε μετά την 1<sup>η</sup> στήλη (3) και
- ✓ Η τελευταία στα δεξιά διαδρομή είναι η EDN μετά τη 2<sup>η</sup> στήλη (4). Τη βλέπουμε στα 18,4kDa, που είναι και το επιθυμητό.



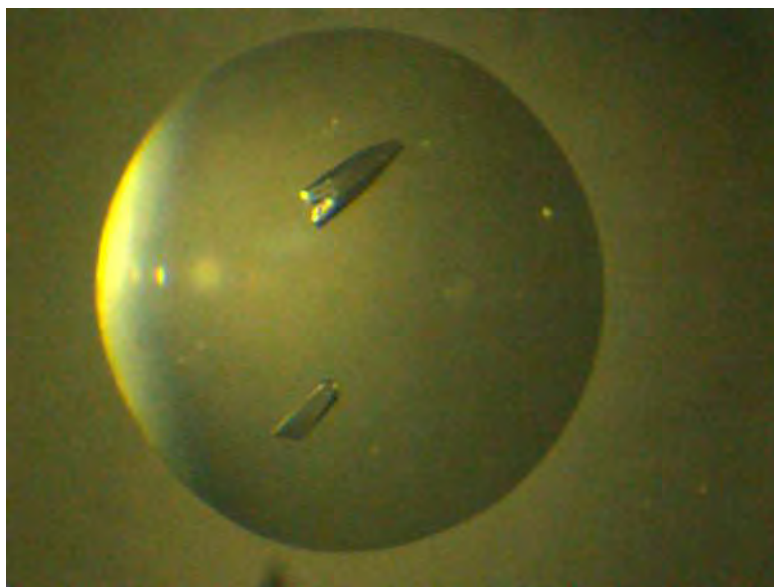
**Εικόνα 23:** Gel ηλεκτροφόρησης EDN μετά από χρώση με Coomassie Brilliant Blue Staining.

### **3.3. Απόδοση καθαρισμού**

Η καθαρή EDN που προέκυψε μετά τον καθαρισμό ήταν 0,424 mg/ml. Στη συνέχεια, η καθαρή ηωσινοφιλική νευροτοξίνη συμπυκνώθηκε στα 8,5 mg/ml προκειμένου να σχηματιστούν κρύσταλλοι, για τους οποίους η απαιτούμενη συγκέντρωση πρωτεΐνης είναι 3,5 mg/ml.

### **3.4. Κρυστάλλωση**

Κρύσταλλοι της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης σχηματίστηκαν με τη μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας. Οι πρώτοι κρύσταλλοι εμφανίστηκαν μετά από 3 - 4 μέρες στους 16 °C. Κατά τα πρώτα πειράματα κρυστάλλωσης είχαμε την ανάπτυξη μεγάλου αριθμού κρυστάλλων μικρού μεγέθους πιθανώς λόγω της υψηλής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης, έτσι το πείραμα επαναλήφθηκε με χαμηλότερη συγκέντρωση πρωτεΐνης και έτσι σε κάθε σταγόνα αναπτύχθηκαν 1-2 κρύσταλλοι ικανοποιητικού μεγέθους (*Εικόνα 24*).



**Εικόνα 24:** Κρύσταλλος της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης.

### **3.5. Κινητικά αποτελέσματα**

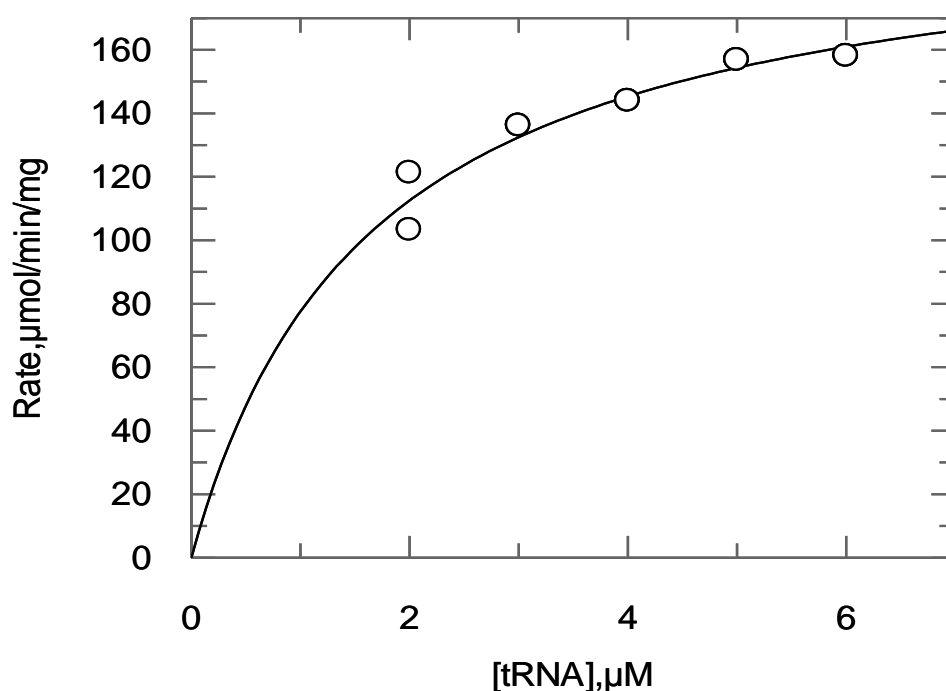
Όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων  $K_m$  και  $V_{max}$  της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης (*Εικόνες 25,26*) παρασκευάστηκαν με βάση το πρωτόκολλο που δίνεται στην αντίστοιχη υποενότητα του πειραματικού τμήματος. Να σημειωθεί, πως η επιλογή των συγκεντρώσεων της EDN και του tRNA που χρησιμοποιήθηκαν έγινε μετά από αρκετές δοκιμές κάτω από

μεταβαλλόμενες συνθήκες. Με βάση τις δοκιμές αυτές, κρίθηκε κατάλληλη η επώαση των δειγμάτων στους 30 °C καθώς και ο χρόνος αντίδρασης (5min).

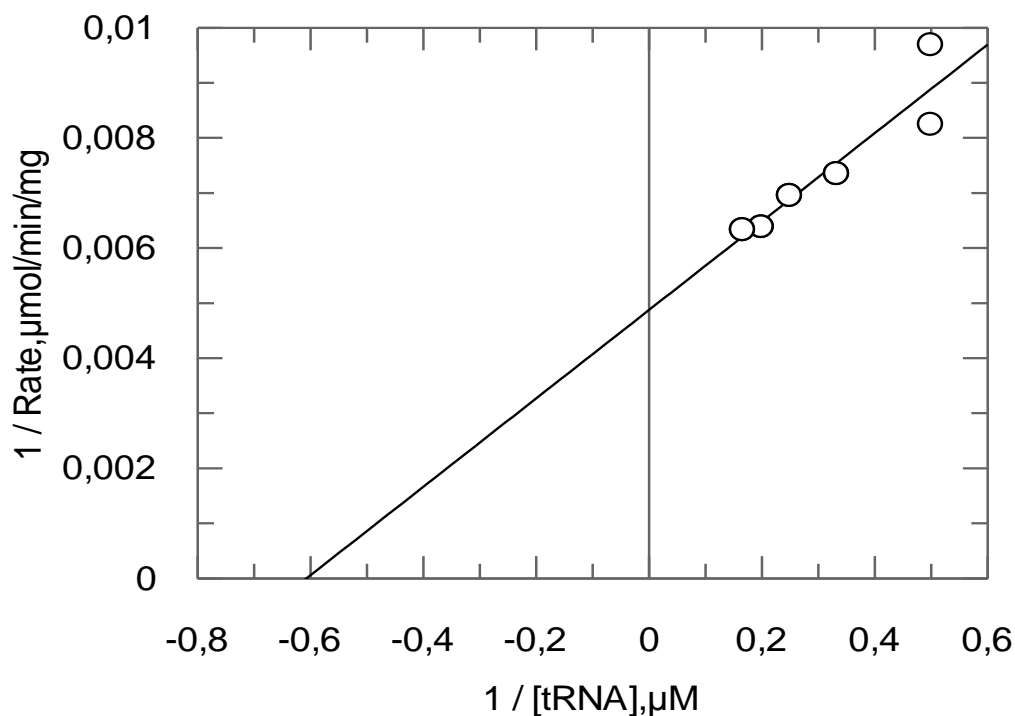
Από τα πειράματα αυτά, και μετά από επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Graffit βρέθηκε πως τα κινητικά χαρακτηριστικά του ενζύμου είναι τα ακόλουθα:

$$K_m = 1,65 \pm 0.28 \mu M, \text{ και}$$

$$V_{max} = 205,2 \pm 11.14 \mu mol \text{ CMP}/mg/min$$



**Εικόνα 25:** Διάγραμμα κινητικής μελέτης της EDN σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος tRNA (2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 μM). Α. Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος.



**Εικόνα 26:** Το αντίστροφο διάγραμμα *Lineweaver-Burk* που δείχνει τη σχέση του υποστρώματος και της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από το οποίο προκύπτουν οι τιμές  $K_m$  και  $V_{max}$ .

Για τη μελέτη της αναστολής της EDN από τους αναστολείς **4d** και **6d**, πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέων και συγκέντρωση υποστρώματος **2μM** και **4μM** αντίστοιχα. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στο σχετικό εδάφιο. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν τα παρακάτω:

$$\mathbf{4d: IC_{50} = 534.73 \pm 16.43 \mu M}$$

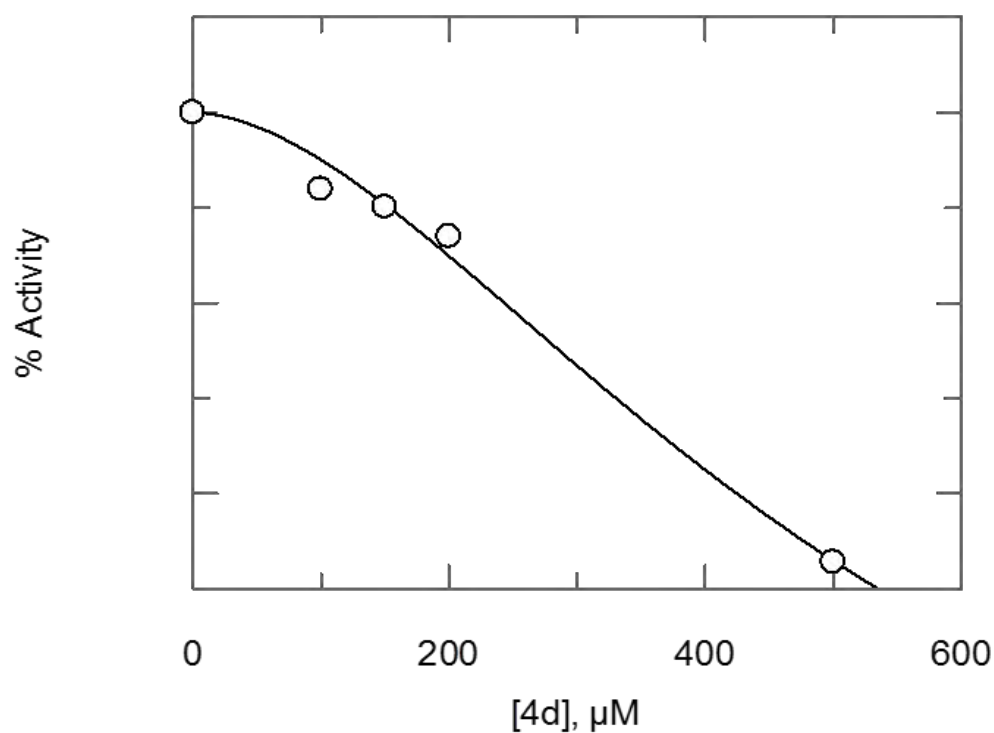
$$\mathbf{6d: IC_{50} = 1462.76 \pm 109.83 \mu M}$$

$$\mathbf{K_i = 241,73 \pm 45,62 \mu M}$$

$$\mathbf{K_i = 427,18 \pm 75,67}$$

Ο υπολογισμός της  $IC_{50}$  των **4d** και **6d** αναστολέων έγινε μέσω του προγράμματος **Grafit**, ενώ η μετατροπή της τιμής της  $IC_{50}$  σε  $K_i$  πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα **EUREKA** και τη σχέση  $K_i = \frac{IC_{50}}{(S / K_m + 1)}$ . Στις **Εικόνες 27 και 28**,

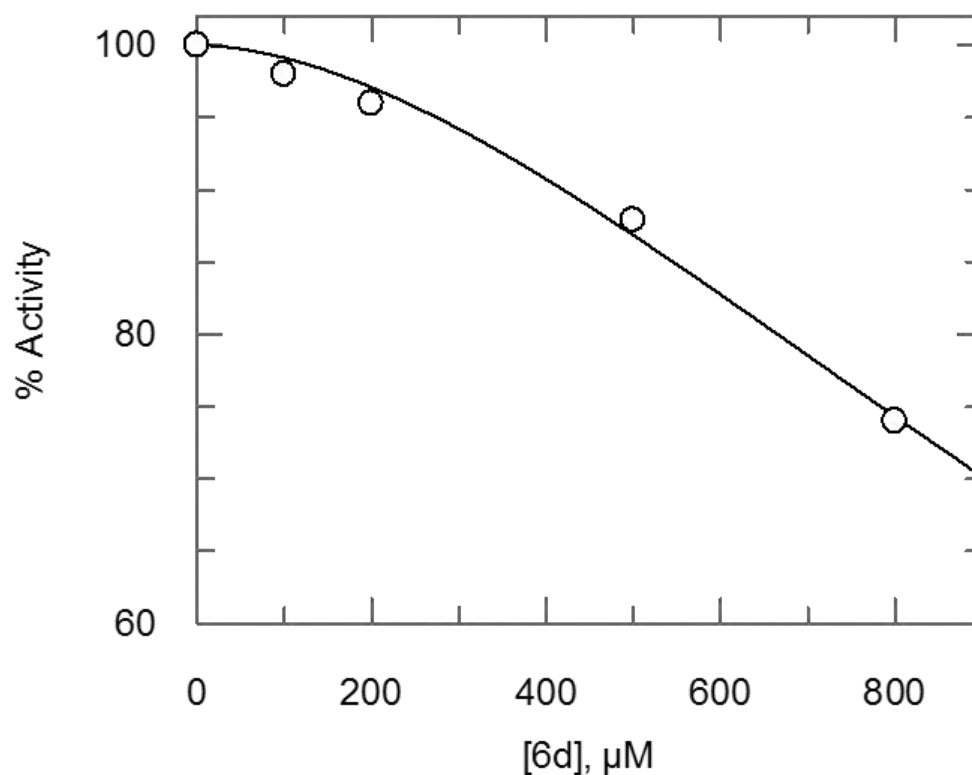
δίνεται η επί της εκατό ενζυμική δραστηριότητα της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης σε σχέση με τη συγκέντρωση του αναστολέα που χορηγείται κάθε φορά. Η μικρότερη ενζυμική δραστηριότητα, και κατ' επέκταση η μεγαλύτερη μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης παρατηρείται στα **500 μM** χορηγούμενου **4d** αναστολέα και στα **800 μM** χορηγούμενου αναστολέα **6d** με βάση το διάγραμμα.



***Εικόνα 27:** Η επί της εκατό ενζυμική δραστηριότητα της EDN σε σχέση με τη συγκέντρωση του χορηγούμενου κάθε φορά αναστολέα. Η μικρότερη ενζυμική δραστηριότητα, και κατ' επέκταση η μεγαλύτερη μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης παρατηρείται στα 500  $\mu\text{M}$  χορηγούμενου 4d αναστολέα.*

**$IC_{50} = 534.7 \pm 16.4 \mu\text{M}$**  από όπου προέκυψε η τιμή:

**$K_i = 241,73 \pm 45,62 \mu\text{M}$**



**Εικόνα 28:** Η επί της εκατό ενζυμική δραστηριότητα της EDN σε σχέση με τη συγκέντρωση του χορηγούμενου κάθε φορά αναστολέα. Η μικρότερη ενζυμική δραστηριότητα, και κατ' επέκταση η μεγαλύτερη μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας της ηωσινοφιλικής νευροτοξίνης παρατηρείται στα 800  $\mu\text{M}$  χορηγούμενου 6d αναστολέα.

**$IC_{50} = 1462.8 \pm 109.8 \mu\text{M}$**  από όπου προέκυψε η τιμή:

$$K_i = 427,18 \pm 75,67$$

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (EDN) όπως περιγράφεται λεπτομερώς στην εισαγωγή, είναι μια πρωτεΐνη που εκκρίνεται από τα κοκκία των ηωσινόφιλων κυττάρων. Τα τελευταία χρόνια έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον πολυάριθμων ερευνητικών κέντρων λόγω της νευροτοξικής της δράση και της εμπλοκής της σε αλλεργικές παθήσεις και φλεγμονές που σχετίζονται με τα ηωσινόφιλα.

Η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη, είναι μια ριβονουκλεάση η οποία ανήκει στην υπερικογένεια της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A (RNase A). Η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη και η ριβονουκλεάση A, παρουσιάζουν 36% ομολογία στην αμινοξική τους αλληλουχία, καθώς και 46% ομοιότητα. Γνωρίζοντας, πως η ριβονουκλεολυτική δράση της EDN σχετίζεται άμεσα με τις βιολογικές της δράσεις γίνονται μελέτες αναστολής με στόχο την χαρτογράφηση της εξειδίκευσης του καταλυτικού της κέντρου αλλά και της διαλεύκανσης του καταλυτικού της μηχανισμού. Λόγω των ομοιοτήτων λοιπόν με την RNase A η εύρεση των κατάλληλων αναστολέων, στέκονται τα δεδομένα μελετών που αφορούν την RNase A. Τα χαρακτηριστικά της EDN, μετά από κινητικές μελέτες βρέθηκαν ότι είναι  $K_m = 1,65 \pm 0,28 \mu M$  και  $V_{max} = 205,2 \pm 11,14 \text{ mol CMP/mg/min}$ . Οι αναστολείς που μελετήθηκαν, 4d και 6d εμφανίζουν ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της RNase A με σταθερές αναστολής  $K_i$  94,8  $\mu M$  και 44,5  $\mu M$  αντίστοιχα<sup>53</sup>. Η μελέτη μας έδειξε πως οι ενώσεις αυτές έχουν επίσης ανασταλτική δράση έναντι της EDN αν και η ανασταλτική τους ισχύ είναι σημαντικά μικρότερη από την αντίστοιχη για την RNase A. Επίσης φαίνεται πως σε αντίθεση με την RNase A στην EDN ο 6d είναι ισχυρότερος από τον 4d υποδηλώνοντας πως η σύνδεση τους είναι διαφορετική στα δύο ένζυμα και θα απαιτηθούν κρυσταλλογραφικά πειράματα για την αποκάλυψη των δομικών λεπτομερειών της σύνδεσης τους στην EDN. Η παρούσα μελέτη και τα αποτελέσματα της ενισχύουν την ερευνητική προσπάθεια για την ανάπτυξη αναστολέων ειδικών για την EDN μέσω της τροποποίησης αναστολέων της RNase A.



## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1]: Hillman RS, Kenneth AA, Rinder HM (2005). "Hematology in Clinical Practice". 4th Edition, Copyright B. Published by McGraw-Hill, Blacklick, Ohio, U.S.A..
- [2]: Gerald J. Gleich, David A. Loegering . Immunobiology of Eosinophils. Annu Rev Immunol. 1984;2:429-59.
- [3] : Gleich GJ, Adolphson CR. The eosinophilic leukocyte: structure and function. Adv Immunol. 1986;39:177-253.
- [4] : Helene F. Rosenberg, Kimberly D. Dyer & Paul S. Foster. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. Nature Reviews Immunology 13, 9-22 (January 2013) / doi:10.1038/nri3341.
- [5]: Rothenberg ME, Hogan SP. Ann. Rev. Immunol 2006;24:147–174. [PubMed: 16551246].
- [6] : Goldsby R., Kindt T., Osborne B., Kubly J. (2007). Ανοσολογία, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
- [7]: Todd I., Spickett G. (2008) Ανοσολογία. 5th Edition. Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου.
- [8]: Rosenberg , H.F. , and J.B. Domachowke. 2001. Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens. J. Leukoc. Biol. 70 :691 – 698 .
- [9]: Pearce , E.J. , and A.S. MacDonald . 2002. The immunobiology of schistosomiasis. Nat. Rev. Immunol. 2 :499 – 511 .
- [10]: Walsh , G.M. 2001 . Eosinophil granule proteins and their role in disease. Curr. Opin. Hematol. 8 : 28 – 33.
- [11]: Wardlaw AJ, Brightling C, Green R, Woltmann G, Pavord I. Eosinophils in asthma and other allergic diseases. Br Med Bull. 2000;56(4):985-1003.
- [12]: Costello RW, Schofield BH, Kephart GM, Gleich GJ, Jacoby DB, Fryer AD. Localization of eosinophils to airway nerves and effect on neuronal M2 muscarinic receptor function. Am J. Physiol 1997; 273: L93-103.
- [13]: Domachowske, J. B., C. A. Bonville, K. D. Dyer and H. F. Rosenberg, 1998a Evolution of antiviral activity in the ribonuclease A gene superfamily: evidence for a

- specific interaction between eosinophil-derived neurotoxin (EDN/RNase 2) and respiratory syncytial virus. Nucleic Acids Res. 26: 5327–5332.*
- [14]: Durack DT, Ackerman SJ, Loegering DA, Gleich GJ. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 1981;78:5165–5169. [PubMed: 6946462].
- [15]: Slifman NR, Venge P, Peterson CG, McKean DJ, Gleich GJ. *J Immunol* 1989;143(7):2317–2322. [PubMed: 2506283].
- [16]: Hamann, K. J., Ten, R. M., Loegering, D. A., Jenkins, R. B., Heise, M. R., Schad, C. R., Pease, L. R., Gleich, G. J., and Barker, R. L. (1990) *Genomics* 7, 535–546.
- [17]: Gleich GJ, Loegering DA, Bell MP, Checkel JL, Ackerman SJ, McKean DJ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986;83:3146–3150. [PubMed: 3458170].
- [18]: Slifman NR, Loegering DA, McKean DJ, Gleich GJ. *J. Immunol* 1986;137:2913–2917. [PubMed: 3760576].
- [19]: Hamann KJ, Barker RL, Loegering DA, Gleich GJ. *J. Parasitol* 1987;73:523–529. [PubMed: 3598802].
- [20]: Ackerman SJ, Gleich GJ, Loegering DA, Richardson BA, Butterworth AE. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1985;34:735–745. [PubMed: 4025686].
- [21]: Newton DL, Walbridge S, Mikulski SM, Ardeli W, Shogen K, Ackerman SJ, Rybak SM, Youle RJ (1994) *The Journal of Neuroscience* 14(2): 538-544.
- [22]: Fredens K, Dahl R, Venge P (1982) *J Allergy Clin Immunol* 70(5): 361-366.
- [23]: Sorrentino S, Glitz DG, Hamann KJ, Loegering DA, Checkel JL, Gleich GJ (1992) *J Biol Chem* 267(21): 14859-65.
- [24]: Garofalo R, Kimpen JL, Welliver RC, Ogra PL. *J Pediatr* 1992;120(1):28–32. [PubMed: 1731020].
- [25]: Harrison AM, Bonville CA, Rosenberg HF, Domachowske JB. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159(6):1918–1924. [PubMed: 10351940].
- [26]: Rosenberg H.F and Joseph B. Domachowske (2001). *Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens. Journal of Leukocyte Biology, Volume 70, November 2001.*
- [27]: Rugeles , M.T. , C.M. Trubey , V.I. Bedoya , L.A. Pinto , J.J. Oppenheim , S.M. Rybak , and G.M. Shearer . 2003 . *Ribonuclease is partly responsible for the HIV-1 inhibitory effect activated by HLA alloantigen recognition.* *AIDS* . 17 : 481 – 486 .

- [28]: Mosimann SC, Newton DL, Youle RJ, James MN (1996). "X-ray crystallographic structure of recombinant eosinophil-derived neurotoxin at 1.83 Å resolution." *J. Mol. Biol.* 260 (4): 540–52. doi:10.1006/jmbi.1996.0420. PMID 8759319.
- [29]: Sikriwal Deepa, Divya Seth, Shama Parveen, Anu Malik, Shobha Broor, and Janendra K. Batra (2012). An Insertion in Loop L7 of Human Eosinophil-Derived Neurotoxin Is Crucial for its Antiviral Activity. *Journal of Cellular Biochemistry* 113:3104-3112 (2012).
- [30]: Yang D, Chen Q, Su SB, Zhang P, Kurosaka K, Caspi RR, Michalek SM, Rosenberg HF, Zhang N, Oppenheim JJ. *J. Exp. Med* 2008;205(1):75–90.
- [31]: Yang , D. , Q. Chen , H.F. Rosenberg , S.M. Rybak , D.L. Newton , Z.Y. Wang , Q. Fu , V.T. Tchernev , M. Wang , B. Schweitzer , et al . 2004 .Human ribonuclease A superfamily members, eosinophil-derived neurotoxin and pancreatic ribonuclease, induce dendritic cell maturation and activation. *J. Immunol.* 173 : 6134 – 6142 .
- [32]: De Yang , Qian Chen , Shao Bo Su , Ping Zhang , Kahori Kurosaka ,Rachel R. Caspi , Suzanne M. Michalek , Helene F. Rosenberg , Ning Zhang , and Joost J. Oppenheim . Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2 – MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses. Cite by DOI: 10.1084/jem.20062027.
- [33]: Newton DL, Nicholls PJ, Rybak SM, Youle RJ (1994) *J Biol Chem* 269(43): 26739-45.
- [34]: Newton DL, Xue Y, Boqué L, Wlodawer A, Kung HF, Rybak SM (1997) *Protein Eng* 10(4): 463-70.
- [35]: Chusid MJ, Dale DC, West BC, Wolff SM (1975). The hypereosinophilic syndrome: analysis of fourteen cases with review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 1975 Jan;54(1):1-27. Review.
- [36]: Hertzman PA, Blevins WL, Mayer J, Greenfield B, Ting M, Gleich GJ (1990). Association of the eosinophilia-myalgia syndrome with the ingestion of tryptophan. *N Engl J Med.* 1990 Mar 29;322(13):869-73.
- [37]: Bulpitt KJ, Verity MA, Clements PJ, Paulus HE, (1990). Association of L-tryptophan and an illness resembling eosinophilic fasciitis. Clinical and histopathologic findings in four patients with eosinophilia-myalgia syndrome. *Arthritis Rheum.* 1990 Jul;33(7):918-29. Department of Medicine, University of California, Los Angeles School of Medicine.
- [38]: Martin RW, Duffy J, Engel AG, Lie JT, Bowles CA, Moyer TP, Gleich GJ, (1990). The clinical spectrum of the eosinophilia-myalgia syndrome associated with

*L-tryptophan ingestion. Clinical features in 20 patients and aspects of pathophysiology.* Ann Intern Med. 1990 Jul 15;113(2):124-34.

[39]: Shin S-W, Park JS, Park C-S (2013) Elevation of Eosinophil-Derived Neurotoxin in Plasma of the Subjects with Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease: A Possible Peripheral Blood Protein Biomarker. PLoS ONE 8(6): e66644. doi:10.1371/journal.pone.0066644.

[40]: Leonidas et al. 2001, J. Biol. Chem. 276, 15009-15017.

[41]: Swaminathan GJ, Holloway DE, Veluraja K, Acharya KR, (2002). Atomic resolution (0.98 Å) structure of eosinophil-derived neurotoxin. Biochemistry. 2002 Mar 12;41(10):3341.

[42]: Chang C, Newton DL, Susanna M, Rybak M, S and Wlodawer A (2002). J. Mol. Biol. 317: 119-130.

[43]: Rosenberg H.F. (1998). Isolation of recombinant secretory proteins by limited induction and quantitative harvest. Biotechniques. 1998 Feb;24(2):188-90, 192.

[44]: Moussaoui M, Noques V, Guash A, Barman T, Travers F, Cuchillo CM (1998). J Biol Chem. 273(40):25565-25572.

[45]: Stryer, L., Berg J.M. and Tymoczko, J.L. (2002). Biochemistry, 5th ed. W.H. Freeman, pp 1050.

[46]: A new remote subsite in ribonuclease A. Barbra M. Fisher, Juneko E. Grilley, Ronald T. Raines (1998). Journal of Biological Chemistry 273, 34134 - 34138.

[47]: Giuseppe D' Alessio and Riordan JF (1998). Protein Science 7:804-805.

[48]: Sorrentino S. (1998). Human extracellular ribonucleases: multiplicity, molecular diversity and catalytic properties of the major RNase types, CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 54,785–794.

[49]: Boix E, Nikolovski Z, Moiseyev GP, Rosenberg HF, Cuchillo CM, Nogués MV(1999). Kinetic and product distribution analysis of human eosinophil cationic protein indicates a subsite arrangement that favors exonuclease-type activity. J Biol Chem. 1999 May 28;274(22):15605-14.

[50]: Sikriwal Deepa, Divya Seth and Janendra K.Batra (2009). Role of catalytic and non-catalytic subsite residues in ribonuclease activity of human eosinophil-derived neurotoxin. Biol. Chem., Vol390, pp.225-234, March, 2009.

[51]: Γεωργάτσος Ι.Γ., Γιουσάνης Τ.Α., Κυριακίδης Δ.Α (2001). Ενζυμολογία. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.

[52]: Berg M.J., Tymoczko L.J., Stryer L. (2009) *Βιοχημεία, Τόμος Ι*. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

[53]: Parmenopoulou V., Chatzileontiadou DSM, Manta S, Bougiatioti S, Maragozidis P, Gkaragkouni ND., Kaffesaki E, Kantsadi AL., Skamnaki VT, Zographos SE, Zounpoulakis P, Balatsos NAA, Komiotis D. and Leonidas DD. (2012). *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20: 7184–7193.

[54]: Anfinsen C.B. et al. *J Biol. Chem.* 1954.